

**RESORPTION UND METABOLISMUS
VON DIBUTYLNITROSAMIN
IM DÜNNDARM DER RATTE IN SITU**

XU - CHANG FENG

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Walther-Straub-Institut
für
Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

RESORPTION UND METABOLISMUS
VON DIBUTYLNITROSAMIN
IM DÜNNDARM DER RATTE IN SITU

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

X U - C H A N G F E N G

aus Shanghai

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Loeschke
Prof. Dr. H. Fritz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. E. Richter

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.1987

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1.	Zusammenfassung	1
1.2.	Summary	5
2.	EINLEITUNG	9
2.1.	Bildung und Vorkommen von Nitrosaminen	9
2.2.	Die biologische Wirkung von Nitrosaminen	10
2.3.	Beziehung zwischen Metabolismus und cancerogener Wirkung der Nitrosamine	11
2.4.	Beziehung zwischen den Stoffwechsel und der cancerogenen Wirkung von NDBA	15
2.5.	Einfluß von Ethanol auf den NDBA-Stoffwechsel	18
2.6.	Zielsetzung der vorgelegten Arbeit	20
3.	ERGEBNIS	22
3.1.	Aufnahme der Gesamtradioaktivität in das Blut	22
3.2.	Stoffwechsel von NDBA in durchbluteten Darmschlingen <u>in situ</u>	26
3.2.1.	Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Dosis	26
3.2.2.	Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität	27
4.	DISKUSSION	36
4.1.	Kritische Betrachtung der verwendeten Methode	36
4.1.1.	Untersuchungsmethode	36
4.1.2.	Analytische HPLC	38
4.2.	Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Jejunum <u>in situ</u>	39
4.2.1.	Resorption aus durchbluteten Darmschlingen <u>in situ</u>	39
4.2.2.	Metabolismus in durchbluteten Darmschlingen <u>in situ</u>	40

4.3.	Resorption und Metabolismus einer hohen NDBA-Dosis im Jejunum <u>in situ</u>	42
4.4	Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Ileum <u>in situ</u>	43
4.5.	Einfluß von Ethanol auf Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Jejunum <u>in situ</u>	45
4.6.	Toxikologische Bedeutung der Präsystemischen Verstoffwechslung von NDBA im Dünndarm	46
5.	MATERIAL UND METHODEN	48
5.1.	Material	48
5.1.1.	Versuchstiere	48
5.1.2.	Reagenzien	48
5.2.	Methoden	50
5.2.1.	Untersuchungsmethoden	50
5.2.2.	HPLC	53
5.2.3.	Messung der Radioaktivität	55
6.	LITERATURVERZEICHNIS	57
7.	TABELLEN	66
8.	BEDEUTUNG VERWENDETER KÜRZEL	79

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Zusammenfassung

N-Nitrosodibutylamin (NDBA) ist eines der wenigen Nitrosamine, die neben Tumoren in anderen Organen Harnblasenkrebs erzeugen können. Durch Untersuchung im Dünndarm von Ratten *in vitro* wurde schon nachgewiesen, daß NDBA im Dünndarm leicht und hauptsächlich durch ω -Oxidation zu N-Nitrosobutyl-(3-carboxypropyl)amin (NBCPA) verstoffwechselt werden kann. NBCPA ist verantwortlich für den Harnblasenkrebs.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach Winne (78), durchblutete Dünndarmschlingen von Ratten in situ, verwendet. Nach der Injektion von ^{14}C -NDBA in eine abgebundene Darmschlinge wurde das Blut aus der Vene der Darmschlinge 36 Minuten lang in ein- (erste 10 Minuten) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen und die Erscheinsrate der Radioaktivität im Blut bestimmt. Die Metaboliten in den Plasmaanalysen wurden mit HPLC gemessen. Die Untersuchung der Resorption und des Metabolismus von NDBA wurde in der Darmschlinge unter in situ Bedingungen in den folgenden vier Gruppen durchgeführt:

- Gruppe A: niedrige NDBA Dosis von 17,6 nM im Jejunum
- Gruppe B: niedrige NDBA Dosis von 12,9 nM + 1 % (v/v) Ethanol im Jejunum
- Gruppe C: hohe NDBA Dosis von 605 nM im Jejunum
- Gruppe D: niedrige NDBA Dosis von 12,9 nM im Ileum

Das Ergebnis hat gezeigt:

- (1). NDBA wurde bei allen Gruppen sehr schnell aus der Darmschlinge resorbiert. Schon 1 min nach Applikation von ^{14}C -NDBA konnte Radioaktivität im Blut nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten 10 min gab es eine Resorptionsspitze, der Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve entspricht dem einer passiven Resorption.

- (2). NDBA wurde während der Resorption auch sehr rasch metabolisiert. Entsprechend zur Resorptionsspitze verlief gleichzeitig die Metabolitenspitze im Plasma. Das bedeutet, daß der NDBA Stoffwechsel in den Darmepithelien von der Konzentration des Substrats abhängig ist. NDBA wurde in Dünndarmschlingen von Ratten in situ hauptsächlich durch ω -Oxidation zu N-Nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amin (NB4HBA) und weiter zu NBCPA verstoffwechselt. Dies entspricht den Ergebnissen mit einer Darmpräparation in vitro.
- (3). Die niedrige Dosis von 17,6 nM NDBA wurde leicht und schnell im Jejunum resorbiert. Nach 36 min waren 57,8 % der Dosis resorbiert. Vom Maximum der resorbierten Radioaktivität wurden 50 % nach 6,79 min (HZ) und 90 % in weniger als 25 min resorbiert. In den ersten 4 min lagen bereits 75 % der resorbierten Radioaktivität in Form von Metaboliten vor und nach 36 min waren dies 93,3 %. Die Summe der Metaboliten im Plasma betrug 88,2 %. Der Hauptanteil bestand aus sauren Metaboliten, 51,3 % der Gesamtradioaktivität und 58,1 % der Gesamtmetaboliten.
- (4). Nach Zusatz von 1 % Ethanol (v/v) zu einer niedrigen NDBA Dosis, 12,9 nM, waren im Jejunum nach 36 min 73,6 % der Dosis resorbiert. Dies bedeutete keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe A ohne Ethanolzugabe. Die Resorption benötigte jedoch etwas mehr Zeit, die HZ betrug 8,27 min. In den ersten 4 min waren nur 40,2 % der Gesamtradioaktivität in der Metabolitenfraktion enthalten, nach 36 min 77,7 %. Beide Werte waren deutlich niedriger als in der Gruppe A ohne Ethanolzugabe und ergaben einen Gesamtmetabolitengehalt im Plasma von 66,9 %. Besonders auffallend war der geringere Prozentanteil saurer Metaboliten, nur 33,6 % der Gesamtmetaboliten, d.h. zwei Fünftel im Vergleich zur Gruppe A ohne Ethanol. Das bedeutet, daß Ethanol die Resorption von NDBA verzögert und den Stoffwechsel von NDBA hemmt. Diese

Hemmung findet hauptsächlich auf der Stufe der Weiteroxidation von NB4HBA zu NBCPA statt.

- (5). Nach Applikation einer 35 mal höheren NDBA Dosis resorbierten Jejunumschlingen innerhalb von 36 min 73,6 % der Dosis. Dies war kein signifikanter Unterschied zur Gruppe A mit der niedrigen NDBA Dosis. Die Resorptionsgeschwindigkeit war jedoch mit einer HZ von 9,01 min deutlich langsamer.
- Zu Beginn, in den ersten 4 min, war der Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität nur 11,0 %. Er war auch nach 36 min auf nicht mehr als 42,3 % der Gesamtradioaktivität angestiegen. Beide Werte waren erheblich niedriger als bei der Gruppe A mit der niedrigen NDBA Dosis. Die Summe der Metaboliten im Plasma war mit 22,2 % der Gesamtradioaktivität nur ein Viertel im Vergleich zur Gruppe A mit der niedrigen NDBA Dosis. Die sauren Metaboliten stellten jedoch mit 61 % auch bei der höheren Dosis den Hauptanteil der Gesamtmetaboliten dar. Das bedeutet, daß im Gegensatz zur Stoffwechselhemmung durch Ethanol, der Rückgang der Verstoffwechslung bei der hohen Dosis in erster Linie die primäre Oxidation von NDBA zu NB4HBA und/oder N-Nitrosobutyl-(3-hydroxybutyl)amin (NB3HBA) betrifft, die zwar von der Konzentration des Substrats abhängig ist, aber offensichtlich bei der hohen Konzentration im Darm eine Sättigung erreicht hat.
- (6). Im Ileum wurde von einer niedrigen NDBA Dosis, 12,9 nM, weniger resorbiert als im Jejunum. Die Summe der Resorption betrug nach 36 min nur 44,3 % der Dosis. Die Resorption war, verglichen mit den anderen Gruppen, im Ileum am langsamsten. Die HZ betrug 10,29 min.
- In den ersten 4 min war der Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität nur 14,4 % und selbst nach 36 min nur 69,4 %. Die Summe der Metaboliten im Plasma betrug 40,9 %, d.h. nur halb soviel wie bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum. Auch der Prozentanteil der

sauren Metaboliten an den Gesamtmetaboliten war erniedrigt, er betrug 46,4 %, das sind 10 % weniger als bei Gruppe A. Das bedeutet, daß beim Ileum die im Vergleich zum Jejunum verlangsamte Resorption mit einer niedrigeren Verstoffwechslung des NDBA einhergeht. Die Stoffwechselkapazität für NDBA ist im Ileum schwächer als im Jejunum, und betrifft nicht nur die primäre Oxidation zu NB4HBA und/oder NB3HBA, sondern auch die weitere Oxidation von NB4HBA zu NBCPA.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen das Ergebnis von in vitro Studien, daß dem Dünndarm der Ratte im präsystemischen Metabolismus (first-pass) von NDBA eine bedeutende Rolle zukommt. Es wird der Einfluß des Darmmetabolismus auf die Abhängigkeit der Organotropie der cancerogenen Wirkung von der oralen NDBA-Dosis diskutiert.

1.2. Summary

Absorption and metabolism of N-nitroso-dibutylamine in the small intestine of the rat in situ

N-nitroso-dibutylamine (NDBA) has been known as a potent carcinogen inducing tumors in the urinary bladder besides other organs such as liver and esophagus. Its carcinogenic effect on the bladder is caused by one of its metabolites, N-nitrosobutyl-(3-carboxypropyl)amine (NBCPA), rather than by itself. Previous work has shown that NDBA can be easily metabolized in the rat small intestine in vitro via ω -oxydation to yield NBCPA as major metabolite.

In this work the absorption and metabolism of NDBA in the small intestine of the rat was studied in situ using a modified method according to Winne (78). After injection of ^{14}C -NDBA into a small intestinal loop blood samples of the vein draining the segment were collected during a 36 minutes period in intervals of one (first 10 minutes) to 2 minutes. The absorption rate was determined by measuring total radioactivity in samples of whole blood. NDBA and its metabolites in samples of plasma were separated by high-performance-liquid-chromatography (HPLC). Four groups were investigated in this work as follows:

- Group A: low NDBA dose of 17.6 nM in jejunal segments
- Group B: low NDBA dose of 12.9 nM added with 1 % (v/v) ethanol in jejunal segments
- Group C: high NDBA dose of 605 nM in jejunal segments
- Group D: low NDBA dose of 12.9 nM in ileal segments

The following results were obtained:

- (1). In all of the 4 groups radioactivity was absorbed rapidly by small intestinal segments as indicated by the detection of radioactivity 1 min after application of ^{14}C -NDBA. During the first 4-10 min an absorption peak was seen in the blood. This fits to the law of passive absorption in the intestine after oral administration.
- (2). The kinetics of metabolite absorption paralleled those of the absorption of radioactivity, suggesting that the metabolism of NDBA in rat small intestine is dependent on substrate concentration. The metabolites of NDBA were shown to separate in two parts, neutral (N-Nitrosobutyl-(4-hydroxybutyl)amin, NB4HBA, and -(3-hydroxybutyl)amin, NB3HBA) and acidic (NBCPA) metabolites, indicating -oxidation to be the major biotransformation pathway in rat small intestine in situ as was the case in previous investigations in vitro.
- (3). In group A using a low dose of ^{14}C -NDBA a fast uptake of radioactivity from jejunal segments was observed. 57 % of the dose was absorbed within 36 min. The half life time ($t_{1/2}$) of the appearance of radioactivity in blood was 6.79 min. 90 % of the calculated total uptake was absorbed in less than 25 min.
NDBA at the low dose was rapidly metabolized by jejunal segments. 75 % and 93.3 % of the radioactivity in plasma was contained in the metabolite fraction of plasma samples after 4 and 36 min, respectively. The sum of metabolites in plasma amounted to 88.2 %. The main conversion product of NDBA, the acidic metabolite (NBCPA), comprised 51.3 % of the dose and 58.1 % of total metabolites. Therefore a high capacity for the metabolism of NDBA during its rapid absorption in jejunum segments may be suggested.

- (4). In the group B with low NDBA dose of 12.9 nM added with 1 % (v/v) ethanol, the total absorption of ^{14}C -NDBA in jejunum was 73.6 % of the dose after 36 min. This was not different from the group A without ethanol, although the value was a little bit higher. However, the absorption was somewhat delayed by ethanol. The time to reach 50 % and 90 % of the maximal uptake was 8.27 and 29 min, respectively. An inhibitory effect of ethanol on the metabolism of NDBA was seen. After 4 and 36 min only 40.2 % and 77.7 % of the radioactivity in plasma was contained in the metabolite fraction, respectively. Both values were significantly lower as compared with the values obtained in group A without ethanol. It is important to notice that the acidic part of metabolites decreased dramatically to only 22.8 % of the dose and 36.6 % of total metabolites. The results suggest that ethanol inhibits the metabolism of NDBA mainly through inhibition of the further oxidation of NB4HBA to NBCPA.
- (5). Increasing the NDBA dose in jejunal segments by a factor of 35 resulted in a total absorption of radioactivity of 73.6 % of the dose after 36 min. There was no statistically significant difference to the absorption in group A with a low NDBA dose. However a delay in absorption was seen with a half life of 9.01 min. The percentage of metabolites in plasma was significantly lower at the high dose. During the first 4 min only 11.0 %, after 36 min only 42.3 % of the radioactivity in plasma could be attributed to metabolites, respectively. The sum of metabolites was only 22.2 % of the dose, one fourth of that in group A with a low dose of NDBA. Acidic metabolites remained the major metabolite fraction, 61.0 % of total metabolites. Therefore the decrease in NDBA metabolism is mainly due to a reduction of the primary oxidation of NDBA to NB4HBA. Obviously, this reaction has reached a saturation limit at the high dose.

(6). Ileal segments absorbed a small dose of NDBA more slowly and to a lesser extent as compared to jejunal segments. Total absorption after 36 min amounted to only 44.3 % of the dose. The absorption half life, 10.29, was the longest of all groups. NDBA metabolism during absorption was considerably lower in ileal than in jejunal segments. During the first 4 min only 14.4 % and after 36 min only 69.4 % of the radioactivity in plasma were metabolites, respectively. The sum of metabolites after 36 min was only 1/2 of that in jejunum. Acidic metabolites comprised a lower part of total metabolites (46.4 %), indicating a lower enzyme activity towards NDBA itself as well as towards NB4HBA. As could be observed in the experiments under different conditions in jejunal segments a decrease in NDBA metabolism by the gut wall is accompanied by a slow down of its absorption in the ileum as well.

The present investigation confirm the results of in vitro studies suggesting an important role for rat small intestine in the presystemic metabolism (first-pass) of NDBA. The influence of intestinal metabolism upon the dose dependent organotropy of the tumorigenic effects of oral NDBA is discussed.

2. EINLEITUNG

2.1. Bildung und Vorkommen von Nitrosaminen

Seit dem Bericht von Magee und Barnes im Jahre 1956 (40), in dem die orale Einnahme von NDMA bei Ratten als leberkrebs erzeugend befunden wurde, hat sich die Forschung auf die Chemie der Nitrosamine, ihre Bildung und Vorkommen in der Umwelt und ihre carcinogene Wirkung ausgedehnt. Die Bedeutung der Nitrosamine beruht heute auf den folgenden zwei Gründen: Vorkommen in unserer gesamten Umwelt, besonders in Lebensmitteln, und ihre stark krebserzeugende Wirkung.

Bei Rückstandsuntersuchungen wurden Nitrosaminverbindungen in vielen Nahrungs- und Genußmitteln festgestellt wie z.B. in Tabak, Gemüse, Fleischprodukten, Käse, Bier und in manchen Arzneimitteln (61,75). In der Englischen Küche werden schätzungsweise pro Person und Woche 3,ug Nitrosamine eingenommen (20). In der Deutschen Küche nimmt ein erwachsener Mann durchschnittlich pro Tag 1,1,ug NDMA und 0,1-0,5,ug NPYR zu sich, davon 64 % im Bier und 10 % in Fleischprodukten (61,67).

Neben der exogenen Aufnahme können Nitrosamine aber auch im Körper selbst, in der Mundhöhle, im Magen und im Darm aus sekundären Aminen und Nitrit Nitrosamine entstehen (17,71,72). Besonders das saure Milieu des Magens kommt ihrer Bildung entgegen (18). Es wurde nachgewiesen, daß die NDMA-Bildung etwa bis zu 10,ug/kg Körpergewicht täglich ausmachen kann (72). Nach Verzehr von Spinat wurde schon 200 Minuten später NDMA und NDEA im Blut gefunden (45). Außerdem bilden auch Bakterien im Darm leicht Nitrosamine (27), wodurch die endogene Bildung zusätzlich erhöht werden kann.

Es gibt aber auch Substanzen, die die Bildung von Nitrosaminen hemmen, z.B. Vitamin C (61), Ethanol (77) oder Chloridionen (74). Obwohl sich Nitrosamine überall befinden, kann durch öffentliche Gesundheitsmaßnahmen wie Verzicht auf Rauschen, verbesserte Techniken in der Nahrungsmittelindustrie

und die Benützung von nitrosaminhemmenden Mitteln die Nitrosaminbelastung verringert werden (4).

2.2. Die biologische Wirkung von Nitrosaminen

Ein bedeutsamer Grund für die Nitrosaminforschung ist, wie oben erwähnt, die stark cancerogene Wirkung. Untersuchungen von 65 verschiedenen Nitrosaminverbindungen belegten bei 80 % eine stark cancerogene Wirkung (14). In der Hauptsache trat Leberkrebs auf, außerdem Krebs in Nase, Lunge, Ösophagus, Magen und Nieren.

Die Ausbildung spezieller Krebsformen hängt von bestimmten Verbindungen ab. So erzeugt NDBA Harnblasenkrebs, Nitrosoharnstoffverbindungen erzeugen oft Gehirn- und Wirbelsäulenkrebs und Krebs im peripheren Nervensystem.

Die Lokalisation der Tumoren hängt außerdem oft von der verwendeten Tierart ab. Untersuchungen mit NDEA bei 22 verschiedenen Versuchstieren haben gezeigt (62), daß bei allen Tieren, z.T. aber in verschiedenen Organen, Krebs erzeugt werden kann. Leukämie entwickelt sich z.B. nur bei Mäusen und Fröschen, obwohl auch bei diesen Tierarten sehr selten.

Die cancerogene Wirkung von Nitrosaminen ist auch dosisabhängig (14). Bei chronischer Verfütterung von NDMA in Konzentrationen von 5-50 ppm sank bei Ratten mit abnehmender Dosis auch die Häufigkeit von Leberkrebs (73). Die Höhe der Dosis führt darüber hinaus auch zur Ausprägung verschiedener Krebsformen. Eine einmalige hohe NDEA Dosis von 50 % der LD_{50} erzeugt bei Ratten Nierenkrebs, 2 % der LD_{50} im täglichen Trinkwasser gegeben erzeugt jedoch Leberkrebs; wird diese Dosis auf 0,5 % der LD_{50} verringert, entsteht außer Leberkrebs auch Krebs im Ösophagus (62). In einer anderen Studie bewirkte die orale Dauergabe von NDEA bei Ratten ebenfalls bei einer hohen Dosis Leberkrebs, bei einer niedrigen Dosis Ösophaguskrebs (69).

Die cancerogene Wirkung von Nitrosaminen kann auch durch das Alter (48) und das Geschlecht (32) modifiziert werden. In einem weiteren Bericht wurde gezeigt, daß bei trächtigen Ratten, Mäusen oder Meerschweinchen die Nitrosamine die Placenta zu durchdringen vermögen und einige Zeit nach der Geburt auch bei den Nachkommen Krebs hervorrufen können (31,62).

Nitrosamine stehen auch in enger Beziehung zu manchen Tumoren beim Menschen: In Südamerika besteht die Gewohnheit Tabak zu kauen in dem N-Nitrososornicotine enthalten ist. Die Häufigkeit von Mundhöhlenkrebs ist dort entsprechend hoch (21).

In manchen asiatischen Regionen ist der Ösophagus- und Magenkrebs sehr häufig. Als Grund hierfür wird der Mangel an Spurenelementen in der Erde angesehen. Durch die ungenügend Reduktion der Salpetersäure akkumulieren Nitrate und Nitrite zu sehr. Diese beiden Substanzen sind Vorgänger von Nitrosaminen und so nimmt die Nitrosaminbildung entsprechend zu. In anderen asiatischen Regionen besteht eine Vorliebe für gesalzenes, eingelegtes Gemüse worin große Mengen von Nitrosaminverbindungen enthalten sind (11,21).

Bei Kindern aus dem Iran werden, einem anderen Bericht zufolge, in der Mundhöhle leichter Nitrate zu Nitriten reduziert als dies bei Kindern im Westen der Fall ist. So findet man im Iran häufig Ösophaguskrebs (17).

2.3. Beziehung zwischen Metabolismus und cancerogener Wirkung der Nitrosamine

Magee und Barnes (40), die 1956 die Leberkrebswirkung von NDMA entdeckten, machten das Vorhandensein der N-Methyl-Gruppe für die cancerogene Wirkung verantwortlich ist. Viele spätere Untersuchungen bestätigten ihre Meinung, daß die cancerogene Wirkung erst durch eine Metabolisierung des NDMA aktiviert wird.

Es gibt verschiedene mögliche Stoffwechselvorgänge für Ni-

trosaminverbindungen. Eine der wichtigen Vorgänge ist die α -Oxidation (Abb.1, 36,55,69,70), d.h. die Hydroxylierung am α -C-Atom der Alkylkette. Das entstehende Produkt ist äußerst instabil und zerfällt spontan weiter unter Abspaltung der Seitenketten. Die zweite Seitenkette wird in Form eines Alkylcarbeniumions abgespalten. Diese aktivierte Alkylgruppe kann Bausteine der DNS oder RNS alkylieren, insbesondere die N-7 oder O-6 Position des Guanins, dadurch die genetischen Information verändern und somit cancerogen wirken.

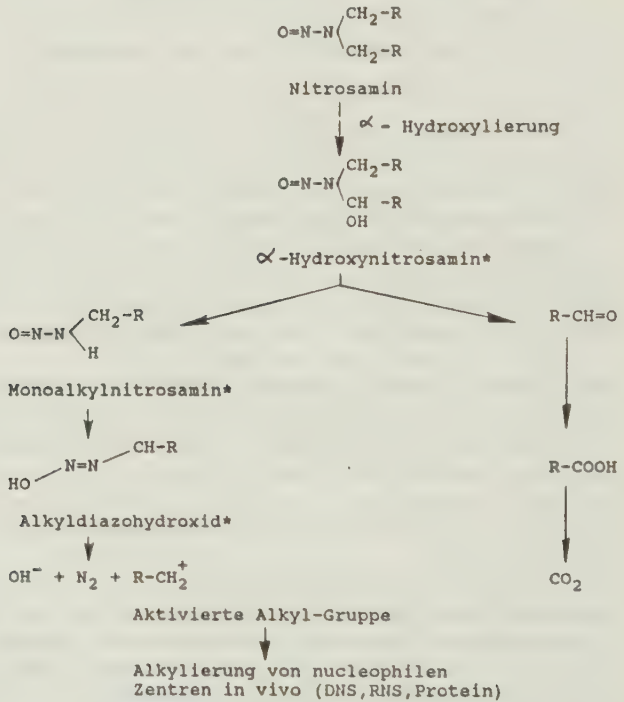


Abb.1 Alpha-Oxidation von Nitrosamin
 Instabile Zwischenstufen sind mit * gekennzeichnet. Bei gleicher Kettenlänge von beiden Resten (R) spricht man von symmetrischen Dialkylnitrosaminen, z.B.
 R=H: NDMA R=CH₃: NDEA R=CH₂-CH₃: NDPA
 R=CH₂-CH₂-CH₃: NDBA R=CH₂-CH₂-CH₂-CH₃: NDAA u.s.w.

Die Untersuchung des NDMA Stoffwechsels in vitro hat gezeigt, daß die α -Hydroxylierung eine enzymatische Reaktion ist. Mindestens zwei Demethylasen des NDMA wurden in der Leber gefunden. Diese beiden Enzyme befinden sich in den Mitochondrien und gehören zu den Cytochrom P-450 abhängigen mischfunktionellen Oxygenasen, die auch NADPH und O_2 brauchen. Ihre Aktivität wird durch Vorbehandlung mit typischen Induktoren wie 3-Methylcholanthren oder polychlorierten Biphenylen jedoch nicht gesteigert, sondern gehemmt. Mit dieser Hemmung geht eine Verringerung der Toxizität und der Tumorzinzidenz einher (2).

Weniger Untersuchungen wurde bisher über den NDEA Stoffwechsel gemacht. Es hat sich jedoch gezeigt, daß es wahrscheinlich auch mehr als eine Form der NDEA-Deethylase gibt (2,36).

Neben der α -Oxidation gibt es noch weitere Möglichkeiten der Stoffwechselabläufe. Als Entgiftung wird die von mischfunktionellen Oxidasen ausgeführte Denitrosierung (36) angesehen. Es wird auch diskutiert, ob an der α -Hydroxylierung Aminoxidasen (36,37) und das so genannte "pH 5 -Enzym" des postmitochondrialen Überstands (2,36) beteiligt sein können. Bei Nitrosaminen mit Kettenlängen von 2 und mehr C-Atomen, kann außer in der α Position die Oxidation auch in der β -, ω -usw. Position stattfinden (36,46). Hat die Alkylkette eines Nitrosamins 4 und mehr C-Atome, dann spricht man bei der Hydroxylierung am Ende dieser Kette von einer ω -Oxidation, bei Hydroxylierung am benachbarten C-Atom von einer ω -1-Oxidation, die beide von erheblicher Bedeutung sein können (s.u.).

Welche dieser möglichen Stoffwechselvorgänge stattfindet ist von drei Faktoren abhängig: Nitrosaminverbindung, Art der Eingabe und Untersuchungsmethode.

Bevor Nitrosamine nach oraler Aufnahme über den arteriellen Kreislauf in den ganzen Körper gelangen, können sie wie alle Fremdstoffe zuerst im Darm, dann in der Leber und schließlich in der Lunge metabolisiert werden (35). Untersuchungen

über den Stoffwechsel von NDMA und NDEA zeigen, daß die Leber das Hauptorgan in diesem Prozess ist und dort als wichtigster Vorgang die α -Oxidation stattfindet (2,5,36,55). In letzter Zeit richtete sich das Augenmerk immer mehr auf den Stoffwechsel von Fremdstoffen im Darm und anderen extrahepatischen Geweben. Eine Untersuchung in Ratten hat gezeigt, daß NPYR in der Leberperfusion in vitro langsamer metabolisiert wird als dies von in vivo Ergebnissen zu erwarten ist. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde postuliert, daß NPYR in vivo auch in extrahepatischen Organen, z.B. den Darm, metabolisiert wird (12).

In einer anderen Untersuchung bei Ratten wurde festgestellt, daß nach der Oralgabe von Methylamin und Nitrit sowohl im Magen als auch im Darm eine Methylierung der DNS nachweisbar ist (28). Agrelo et al (1) berichteten 1978, daß Nitrosamine aus dem Rattendarm sehr schnell resorbiert werden. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem NDMA konnte gezeigt werden, daß während der Resorption in geringem Ausmaß auch eine Metabolisierung stattfindet. Pegg und Perry (55) kamen drei Jahre später mit NDMA und NDEA zu dem selben Ergebnis. In einer anderen Untersuchung (3) wurde nachgewiesen, daß im Colon des Menschen bei der Inkubation in vitro Nitrosamine metabolisiert werden.

Richter et al (58) haben gezeigt, daß von sechs verschiedenen Nitrosaminverbindungen im Rattendarm in vitro 3 Nitrosamine sehr effektiv metabolisiert werden. NDPA wurde in einer Konzentration von 1, μ M/l während der Resorption im Jejunum zu 60 %, im Ileum zu 30 % metabolisiert; NDPA und NDAA wurden in Konzentration unter 10, μ M/l in beiden Dünndarmabschnitten zu mehr als 90 % während der Resorption verstoffwechselt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Metabolisierung umso leichter vor sich geht, je länger die Alkylkette ist.

Eine Untersuchung mit Ratten hat darüber hinaus gezeigt, daß nicht nur die Leber, sondern fast alle Organe NDEA in vitro metabolisieren können. Die Aktivität im Darm war allerdings

so gering, daß sie in vivo keine Rolle spielen dürfte (10). Richter et al (58) konnten bei Perfusion von Dünndarmsegmenten in vitro keinen Abbau von NDEA beobachten.

Die carcinogene Wirkung von Nitrosaminen steht in engem Zusammenhang mit ihrem Stoffwechsel. Da niedrige Dosen bei oraler Einnahme bereits im Darm metabolisiert werden können, ist die Untersuchung über den Stoffwechsel von Nitrosaminen im Darm von hoher aktueller Bedeutung. Es gilt festzustellen, ob dieser Metabolismus im Darm zu einer Giftung oder Entgiftung der Nitrosamine führt und wie sich verschiedene Einflüsse, die aus unseren Ernährungsgewohnheiten und der Belastung mit anderen Umweltgiften resultieren, auf diesen Stoffwechsel auswirken.

2.4. Beziehung zwischen den Stoffwechsel und der cancerogenen Wirkung von NDBA

NDBA gehört zu den symmetrischen Dialkylnitrosaminen (Abb.2). Es entsteht besonders in der Gummiindustrie und kommt in Gummiprodukten wie z.B. Säuglingsschnullern vor (53,66). NDBA ist eines der wenigen Nitrosamine, die im Tierversuch Harnblasenkrebs erzeugen (14,59). Bei zwei von vier Patienten, die an Harnblasenkrebs erkrankt waren, fand man NDBA im Urin (34). Außer Harnblasenkrebs kann NDBA auch Krebs im Ösophagus, in der Leber, in der Lunge und in den Nieren bewirken (59).

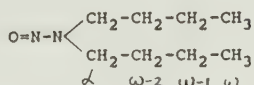


Abb.2 Chemische Struktur von NDBA

Die verschiedenen Positionen der C-Atome in der Alkylkette werden mit α , $\omega-2$, $\omega-1$ und ω gekennzeichnet.

Unter den möglichen Stoffwechselvorgängen nimmt bei NDBA die ω -Oxidation eine wichtige Rolle ein (Abb.3).

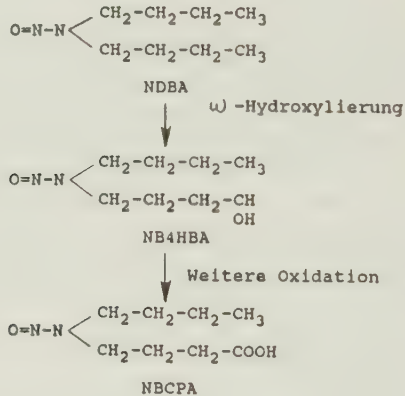


Abb.3 Omega-Oxidation von NDBA

Durch die Hydroxylierung am Ende der Alkylkette entsteht NB4HBA. Dieses wird im Körper rasch weiter oxidiert zu NBCPA, welches für die Auslösung des Harnblasenkrebs verantwortlich gemacht wird (15,51,52).

Druckrey et al (15) fanden 1964 bei ihrer Untersuchung an Ratten nach der Oralgabe von NDBA Harnblasenkrebs. Sie konnten im Urin 10 % der Dosis in Form des Metaboliten NBCPA nachweisen. Auch nach Oralgabe von NB4HBA entwickelte sich Harnblasenkrebs. Dabei wurden im Urin 40 % der Dosis wiederum als NBCPA gefunden.

Okada und Suzuki 1972 (52) fanden 45 % unverändertes NBCPA im Urin 48 Stunden nach Oralgabe von NBCPA.

Hashimoto et al 1972 (25) sahen nach Oralgabe von NBCPA bei allen Ratten Harnblasenkrebs und keinen Krebs in anderen Organen.

Wurde Ratten NB4HBA zusammen mit Disulfiram eingegeben, dann reduzierte sich die Häufigkeit von Harnblasenkrebs von 100 % auf 13 % (30). Disulfiram ist ein anerkannter Hemmstoff der Aldehyddehydrogenase im Ethanolstoffwechsel (13). Es könnte sein, daß dieses Enzym auch an der Oxidation von NB4HBA zu NBCPA beteiligt ist.

Blattmann et al (7,8,9) haben nachgewiesen, daß auch die mittleren C-Atome in der Alkylkette des NDBA hydroxyliert werden können, d.h. es findet eine ω -1 und ω -2 Oxidation statt. Die Gruppe von Okada hat den Stoffwechsel von NDBA und die toxikologischen Eigenschaften der gefundenen Metaboliten sehr intensiv untersucht (Übersicht bei 51). Das durch ω -1 Oxidation entstehende NB3HBA wird hauptsächlich als Glucuronid im Urin ausgeschieden. Es erzeugte bei Ratten keinen Krebs. Weiter Oxidationsprodukte des NB3HBA sowie das durch ω -2 Oxidation entstehende NB2HBA sind nur schwache Carcinogene.

NDBA wird wie andere Nitrosamine auch α -hydroxyliert. Wie schon oben erwähnt verbindet sich die aktivierte Alkylgruppe mit der DNS. Dies konnten Blattmann und Preussmann (6) 1977 in einer Untersuchung mit Lebermikrosomen in vitro nachweisen.

Hashimoto und Kitagawa (24) stellten fest, daß mit NBCPA und NB4HBA kultivierte Harnblasenepithelien auch in vitro in neoplastische Zellen transformiert werden können.

Richter et al (57,58), der den Stoffwechsel von NDBA im Dünndarm von Ratten in vitro untersuchte, fand heraus, daß bei einer Dosis von 1 μ g/l NDBA im Dünndarm > 95 % während der Resorption metabolisiert wird. Außerdem konnte er feststellen, daß mit steigender NDBA-Konzentration der Prozentanteil der Metaboliten geringer wird. Besonders deutlich war dies im Ileum zu sehen. Das Hauptmetabolit, NBCPA, machte 4/5 der gesamten Metaboliten im Jejunum und 2/3 im Ileum aus. Neben NBCPA wurden als weitere Metaboliten NB3HBA und

NB4HBA gefunden (49,81). Nach oraler Verabreichung könnte deshalb der Dünndarm für den NDBA Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen.

2.5. Einfluß von Ethanol auf den NDBA-Stoffwechsel

Ein guter Schluck Wein oder ein kühles Bier wird von den wenigsten Menschen verachtet. Da sich im Bier Ethanol und Nitrosamine, z.B. NDMA (61) befinden, ist die Forschung über den Einfluß von Ethanol auf den Nitrosaminstoffwechsel von allgemeinem Interesse.

Ethanol wird im Magen-Darmtrakt schnell resorbiert. Bei sehr niedrigen Konzentrationen wird bereits im Magen-Darmtrakt ein Teil des Ethanols metabolisiert, bevor er ins Blut gelangt (38). Bei hohen Konzentrationen von Ethanol ist jedoch die Leber das Hauptorgan für den Stoffwechsel. Den Hauptstoffwechselweg von Ethanol zeigt die Abb.4.

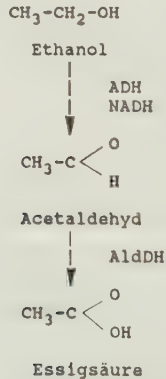


Abb.4 Metabolisierung von Ethanol
ADH: Alkoholdehydrogenase
AldDH: Acetaldehyddehydrogenase

Die cytosolische NADH-abhängige Alkoholdehydrogenase oxidiert Ethanol zu über 90 % zu Acetaldehyd, das weiter zu Essigsäure oxidiert wird. Neben diesem Hauptweg werden 3-8 % auch über Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen zu Essigsäure oxidiert. ADH und AldDH finden in der Leber, desgleichen in den Magen- und Darmschleimhautzellen. Nach der Applikation von Pyrazol, einem Hemmer der ADH oder von Cyanamid, einem Hemmer der AldDH wird der Ethanolstoffwechsel im Magen-Darmtrakt gehemmt (33,38).

Sato et al (60) und Powis (56) zeigten in Rattenversuchen, daß schon nach einer einmaligen oralen Ethanolgabe 14-24 Stunden später ein erhöhter Fremdstoffwechsel in der Leber zu messen war, obwohl die Konzentration des mikrosomalen Proteins und des Cytochrom P-450 sich nicht verändert hatte. Miller und Yang (44) fanden, daß eine einmalige Oralgabe von Ethanol bei Ratten in einer Dosis von 4 g/kg die NADPH-abhängige NDMA-Demethylase induziert.

Während in einer Studie (41) die verstärkte lebertoxische Wirkung von Ethanol mit der Induktion der NDMA-Demethylase in Zusammenhang gebracht werden konnte, gelangte ein anderer Bericht zum entgegengesetzten Ergebnis. Schwarz et al (63) berichten von folgender Untersuchung. Nach drei Wochen Behandlung mit Ethanol im Trinkwasser (30 %, v/v) wurde der Abbau von NDMA in Lebermikrosomen von Ratten um das 3-4 fache gegenüber Kontrollen gesteigert. Wurde aber in das Inkubationsmedium zusätzlich Ethanol in einer Konzentration von 10 μ M gegeben, beobachtete man unabhängig von der Vorbehandlung mit Ethanol, eine mehr als 50 % ige Reduzierung der NDMA Metabolisierung.

Hauber et al (26) inkubierten Leberzellen von Meerschweinchen mit 8 mM Ethanol und NDMA. Nach 10 Minuten wurde noch 90 % unverändertes NDMA gefunden; bei einer Kontrollgruppe ohne Ethanol waren es dagegen nur 20 %. Hauber führt diese Hemmung auf die kompetitive Wirkung von Ethanol und NDMA zurück.

Habs und Schmähl (23) beschreiben, daß Ethanol in der Dosis von 2,5 mg/kg die krebserzeugende Wirkung von NDEA in der Rattenleber von 45 % auf 7 % senkt.

Eine neue Untersuchung (49) hat nachgewiesen, daß Ethanol den NDBA-Stoffwechsel im Dünndarm der Ratten in vitro beeinflusst. In Versuchen mit Ethanolkonzentrationen von 0,06-2 % wurde nur bei der Konzentration von 2 % eine Hemmung des Gesamtstoffwechsels von NDBA festgestellt. Im Resorbat von Jejunumsegmenten reduzierte sich der Metabolitenanteil von 92 % (Kontrolle) auf 72 % (2 % Ethanol). Besonders interessant war jedoch, daß sich der Anteil saurer Metaboliten (im wesentlichen NBCPA) an der Gesamtmetabolitenfraktion unter Einwirkung von Ethanol von 92 % auf 37 % gesenkt hat. Die Hemmung der NBCPA-Bildung konnte bereits bei der niedrigsten Ethanolkonzentration (0,06 %) beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, daß Ethanol kompetitiv die Weiteroxidation von NB4HBA zu NBCPA hemmt.

2.6. Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Bisher war über den Stoffwechsel von NDBA am Dünndarm in situ noch wenig bekannt. Es stellte sich die Frage, ob NDBA während der Resorption durchbluteter Dünndarmschlingen unter in situ Bedingungen, d.h. bei einem im Vergleich zu in vitro Untersuchungen möglicherweise sehr viel rascheren Abtransport mit dem Blut immer noch einer hohen Verstoffwechslung unterliegt. Eine zweite Frage war, ob die Verstoffwechslung bei höheren Konzentrationen stärker abnimmt als in vitro. Außerdem war von Interesse, ob sich Unterschiede zwischen Jejunum und Ileum nachweisen lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die in situ Methode von Winne und Remischovsky (78) modifiziert. Für den Nachweis von NDBA und seinen Metaboliten wurde eine HPLC Analytik angewandt. Resorption und Metabolismus von NDBA im Dünndarm der Ratte wurden wie folgt untersucht:

- A: Es wurde eine niedrige Dosis von NDBA im Jejunum getestet
- B: Mit Jejunumsegmenten wurde bei der niedrigen Dosis der Einfluß von 1 % (v/v) Ethanolzusatz untersucht
- C: In Jejunumsegmenten wurde außerdem der Stoffwechsel nach Zugabe einer 35 mal höheren Dosis von NDBA gemessen
- D: Es wurde auch eine niedrige Dosis von NDBA in Ileumsegmenten getestet

3. ERGEBNIS

3.1. Aufnahme der Gesamtradioaktivität in das Blut

Nach Applikation von ^{14}C -NDBA in eine abgebundene Dünndarmschlinge konnte bereits innerhalb der ersten Minute die Aufnahme von Radioaktivität in das Blut beobachtet werden (Tab.1, Abb.5). Aus Abbildung 5 kann man ersehen, daß die Radioaktivitätsaufnahme pro Minute bei allen vier Gruppen zwischen der 4. und 10. Minute ein Maximum erreichte. Der Spitzenwert betrug bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum 4,5 % der Dosis, nach Zugabe von 1 % Ethanol 5,5 % der Dosis und bei der 35-fach höheren NDBA Dosis 5,0 % der Dosis. Die Werte lagen bei den beiden letzteren Gruppen zwar höher als bei der ersten Gruppe, unterschieden sich von dieser jedoch nicht signifikant. Der Wert in der Spitze betrug bei der niedrigen NDBA Dosis im Ileum nur 2,8 % der Dosis. Das war weniger als bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum ($p < 0,05$).

Tabelle 2 und Abbildung 6 zeigen die kumulative Erschei-
nensrate der Gesamtradioaktivität (% der Dosis) im Blut in
Abhängigkeit von der Zeit. Bedingt durch die langsamere
Aufnahme unterschied sich die ins Blut aufgenommene Ra-
dioaktivität bei Ileumsegmenten ab der 7. Minute signifi-
kant von jener in Jejunumsegmenten.

Tabelle 3 und Abbildung 7 zeigen die Summe der Radioakti-
vität (% der Dosis) im Blut, Darmlumen und Darmgewebe am
Versuchsende nach 36 Minuten. Die Summe der Radioaktivität
betrug im Blut von Jejunumschlingen bei der niedrigen NDBA
Dosis mit 1 % Ethanolzusatz ebenso wie bei der hohen NDBA
Dosis 73,6 % der Dosis. Dieser Wert war zwar höher als im
Jejunum bei der niedrigen NDBA Dosis ohne Ethanolzugabe
(57,8 % der Dosis), der Unterschied war jedoch nicht sig-
nifikant. Die Summe der Radioaktivität die innerhalb von
36 Minuten von einer niedrigen NDBA Dosis durch Ileumseg-
mente aufgenommen wurde, war dagegen mit 44,3 % der Dosis
signifikant geringer als bei der niedrigen NDBA Dosis im
Jejunum ($p < 0,05$).

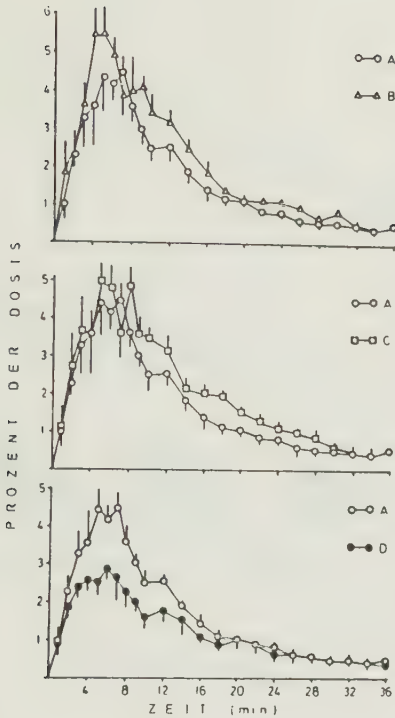


Abb.5 Gesamtradioaktivität (% der Dosis) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanulierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dunndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0.9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen und in einem Aliquot der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten für die Erscheinensrate (Prozent der Dosis) in der Zeit von 5 (Gruppe A: Jejunum, NDBA 17 nM), 6 (Gruppe B: Jejunum, NDBA 12,9 nM + 1 % Ethanol), 6 (Gruppe C: Jejunum, NDBA 605 nM), bzw. 7 (Gruppe D: Ileum, NDBA 12,9 nM) Versuchen.

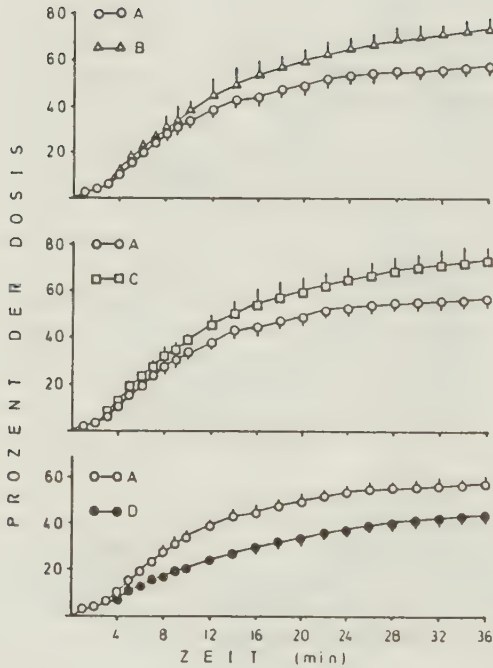


Abb.6 Kumulativ Gesamtradioaktivität (% der Dosis) im Blut
Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen
Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in
das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das ab-
tropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zwei-
minütigem Abstand aufgefangen und in einem Aliquot der Radioakti-
vitätsgehalt bestimmt. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten
für die Erscheinensrate (Prozent der Dosis) in der Zeit von 5
(Gruppe A: Jejunum, NDBA 17 nM), 6 (Gruppe B: Jejunum, NDBA
12,9 nM + 1 % Ethanol), 6 (Gruppe C: Jejunum, NDBA 605 nM), bzw.
7 (Gruppe D: Ileum, NDBA 12,9 nM) Versuchen.

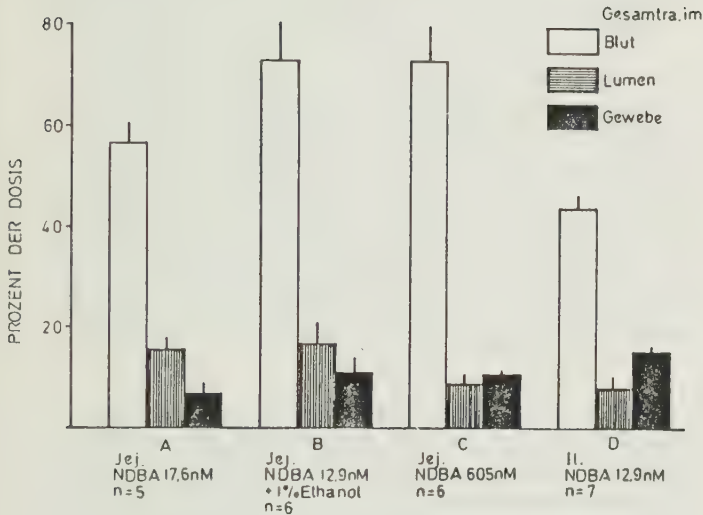


Abb.7 Summe der Gesamtradioaktivität im Blut, Darmlumen und Darmgewebe (% der Dosis)

Nach Kanülierung der abführenden Vene einer Jejunum- (A,B,C) bzw. Ileumschlinge (D) von ca. 10 cm Länge wurde ^{14}C -NOBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Am Versuchsende wurde das Darmsegment mit 1 ml 0,9 % NaCl gespült und anschließend mit 3-4 ml Wasser homogenisiert. In einem Aliquot der Proben von Vollblut, Spülflüssigkeit und Homogenat wurde der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Die Dauer der Versuche betrug nur 36 Minuten. Aus den Mittelwerten für die kumulative Erscheinensrate (Prozent der Dosis) der einzelnen Versuchsgruppen wurde mit Hilfe eines Computerprogramms hochgerechnet (Tab.4, 80) welche theoretische Gesamtaufnahme von Radioaktivität in das Blut für $t \rightarrow \infty$ zu erwarten gewesen wäre. Die maximale Aufnahme hätte nach dieser Rechnung bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum 59,1 % der Dosis, nach Zugabe von 1 % Ethanol (v/v) 77,4 % der Dosis, bei der hohen NDBA Dosis 78,5 % der Dosis und bei der niedrigen NDBA Dosis im Ileum 48,7 % der Dosis betragen. Die Aufnahmegeschwindigkeit war in den vier Gruppen unterschiedlich. Die schnellste Aufnahme erfolgte mit einer Halbwertszeit von 6,8 Minuten bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum. Die Halbwertszeit verlängerte sich durch die Ethanolzugabe auf 8,3 min, bei der hohen NDBA Dosis auf 9,0 min und bei der niedrigen NDBA Dosis im Ileum auf 10,3 min.

Das obige Ergebnis bedeutet, daß im Jejunum kein signifikanter Unterschied in der Aufnahme von Radioaktivität (% der Dosis) zwischen den Gruppen mit zusätzlicher Ethanolgabe bzw. hoher NDBA Dosis und der Gruppe mit der niedrigen NDBA Dosis besteht. Die Aufnahme von NDBA im Ileum ist dagegen geringer und langsamer als bei einer vergleichbaren Dosis im Jejunum.

3.2. Stoffwechsel von NDBA in durchbluteten Darmschlingen in situ

3.2.1. Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Dosis

Das Blut aus der gemeinsamen Vene der Darmschlingen wurde gesammelt und zentrifugiert. NDBA und seine Metaboliten wurden in Plasmasammelproben von je 4 Minuten durch HPLC Analyse getrennt. Es zeigte sich, daß NDBA während der Resorption im Darm metabolisiert wurde. Die maximale Erscheinensrate der Metaboliten (Tab.5; Abb.8) deckte sich zeitlich mit jener der Gesamtradioaktivität. Sie betrug bei der niedrigen NDBA Dosis und nach Zugabe von 1 % (v/v) Ethanol 15 % bzw. 11,7 % der Dosis/4 min, wobei dieser Un-

terschied von keiner signifikanten Bedeutung war. Bei der hohen NDBA Dosis im Jejunum und der niedrigen NDBA Dosis im Ileum betrug die maximal pro 4 min aufgenommene Metabolitenmenge nur 2,8 % bzw. 3,1 % der Dosis, signifikant weniger als bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum ($p < 0,01$).

Tabelle 6 und Abbildung 9 zeigen die Kumulation der Metaboliten in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 36 Minuten war die Summe der Metaboliten bei der niedrigen NDBA Dosis und nach Zugabe von 1 % Ethanol mit 51,6 % bzw. 48,5 % der Dosis nahe zu gleich. Bei der hohen NDBA Dosis im Jejunum und der niedrigen NDBA Dosis im Ileum war die Summe der Metaboliten mit 15,6 % bzw. 17,6 % der Dosis ebenfalls fast gleich, die beiden Werte waren wiederum signifikant niedriger als bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum ($p < 0,01$).

Das oben aufgeführte Ergebnis bedeutet, daß die Summe der kumulierten Metaboliten (% der Dosis) nach 36 Minuten bei der niedrigen NDBA Dosis im Jejunum am höchsten ist. Die Zugabe von 1 % Ethanol (v/v) bewirkt keine signifikante Veränderung in der Summe der kumulierten Metaboliten (% der Dosis). Bei hohen NDBA Dosis ist die Summe der Metaboliten im Jejunum geringer als bei der niedrigen NDBA Dosis. Die absolut gebildete Menge an Metaboliten stieg mit der 35-fach erhöhten Dosis nur um etwa das Zehnfache von 8,99 nM auf 94,38 nM an. Das bedeutet, daß der Metabolismus von NDBA im Jejunum bei der hohen Dosis begrenzt ist. Bei der niedrigen Dosis von NDBA im Ileum ist die Summe der Metaboliten weniger als im Jejunum. Ileumsegmente besitzen also eine geringere Stoffwechselkapazität für NDBA als Jejunumsegmente.

3.2.2. Prozentualer Anteil der Metaboliten an der Gesamtradioaktivität

Die Metaboliten von NDBA konnten z.T. durch HPLC getrennt werden. Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Verteilung

der Radioaktivität zwischen Metaboliten und unverändertem NDBA in Plasmasammelproben von der 4.-8. Minute unter den verschieden Versuchsbedingungen. Wie bereits nachgewiesen (81) zeigt der Produktgipfel bei ca. 5. Minuten den Säuremetaboliten NBCPA an, die Spitze nach 10 Minuten die neutralen Metaboliten und die Spitze nach ca. 13 Minuten das nicht metabolisierte NDBA. Aus den verschiedenen Flächen unter den Produktgipfeln läßt sich der Anteil der jeweiligen Fraktion errechnen.

Abbildung 11 zeigt den prozentualen Anteil von NDBA sowie der sauren bzw. neutralen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität im Plasma in Abhängigkeit von der Zeit. In Tab. 7 wird zusätzlich der prozentuale Anteil der gesamten Metaboliten und dessen prozentuale Verteilung auf saure und neutrale Metaboliten wiedergegeben. Bei der niedrigen NDBA Dosis waren im Jejunum in den ersten 4 Minuten bereits 75 % der aufgenommenen Radioaktivität in den Metabolitenfraktionen enthalten. Bei allen Plasmaproben, die zu späteren Zeitpunkten entnommen wurden zeigte sich, daß über 90 % des aufgenommenen NDBAs metabolisiert waren. Davon bestand der größere Anteil aus sauren Metaboliten, die 53-65 % der gesamten Metaboliten ausmachten (Tab.7A, Abb.11A).

Nach Zugabe von 1% Ethanol (v/v) entfiel nur 40 % der Gesamtradioaktivität in der Plasmaprobe der ersten 4 min auf Metaboliten. Nach 4 min stieg der Prozenteil der Metaboliten zwar an, jedoch langsamer als ohne Ethanolzugabe. Er erreichte durchschnittlich nur 75 %, d.h. 20 % weniger als ohne Ethanol. Dabei ist hervorzuheben, daß der Prozentanteil der sauren Metaboliten immer deutlich unter 50 % der Gesamtmetaboliten blieb und sich, verglichen mit der niedrigen NDBA Dosis ohne Ethanolzugabe, ein signifikanter Unterschied ergab ($p < 0,01$). Der prozentuale Anteil der neutralen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität im Plasma war dagegen nicht geringer als bei der niedrigen NDBA Dosis ohne Ethanolzugabe (Tab.7B, Abb.11B)

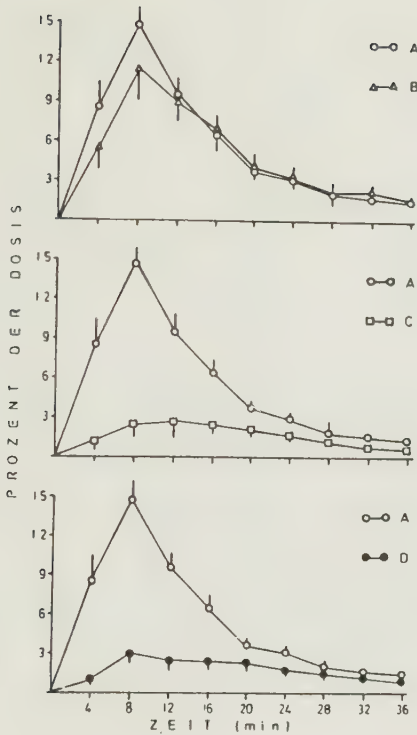


Abb.8 Gesamtmetaboliten im Plasma (% der Dosis) in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0.9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Im Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Gehalt von NDBA und seinen Metaboliten gemessen. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) von 5 (Gruppe A: Jejunum, NDBA 17,6 nM), 6 (Gruppe B: Jejunum, NDBA 12,9 nM + 1 % Ethanol), 6 (Gruppe C: Jejunum, NDBA 605 nM), bzw. 7 (Gruppe D: Ileum, NDBA 12,9 nM) Versuchen.

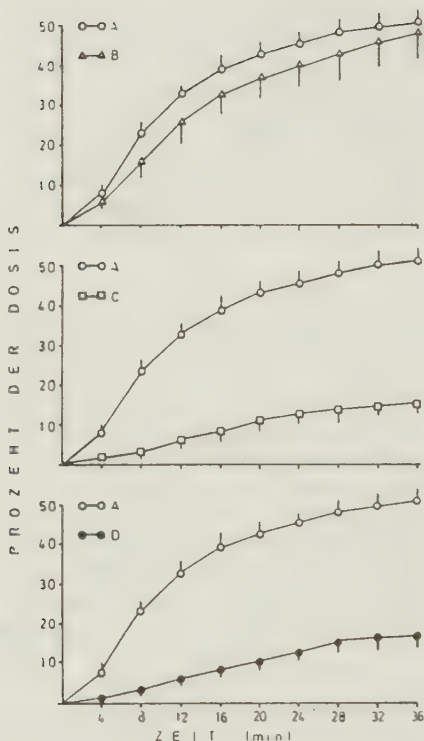


Abb.9 Kumulativer Gesamtmetabolitengehalt im Plasma (% der Dosis) in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Im Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Gehalt von NDBA und seinen Metaboliten gemessen. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_x$) von 5 (Gruppe A: Jejunum, NDBA 17,6 nM) 6 (Gruppe B: Jejunum, NDBA 12,9 nM + 1 % Ethanol), 6 (Gruppe C: Jejunum, NDBA 605 nM), 7 (Gruppe D: Ileum, NDBA 12,9 nM) Versuchen.

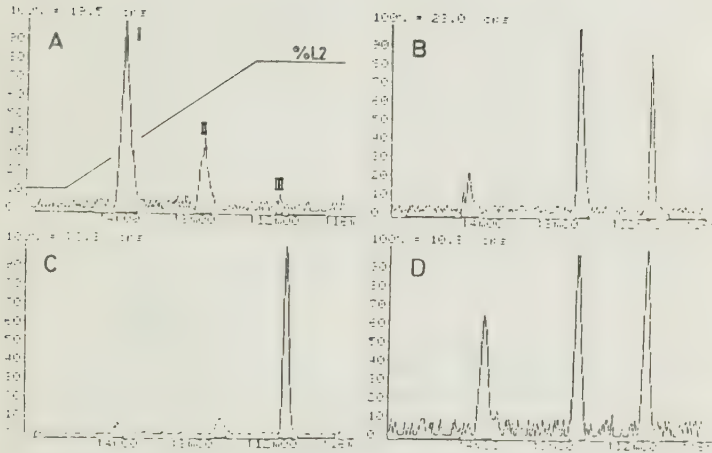


Abb.10 HPLC-Chromatogramme von Plasmaproben

Nach Kanülierung der abführenden Vene einer Jejunum- (A,B,C) bzw. Ileumschlinge (D) von ca. 10 cm Länge wurden 0,5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung mit 17,6 (A), 605 (C), bzw. 12,9 (B,D) nM ^{14}C -NDBA in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. In Experiment B wurde der NDBA-Lösung ausserdem 1 % Ethanol (v/v) zugesetzt. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang im Abstand von ein (erste 10 min) bis 2 min aufgefangen. Plasmasammelpuben von jeweils 4 min wurden mittels HPLC auf NDBA und seine Metaboliten untersucht. Die Spitze der Kurve nach ca. 5 Minuten zeigt die Säuremetaboliten an, die Spitze nach 10 Minuten neutrale Metaboliten und die Spitze nach ca. 13 Minuten nicht metabolisiertes NDBA.

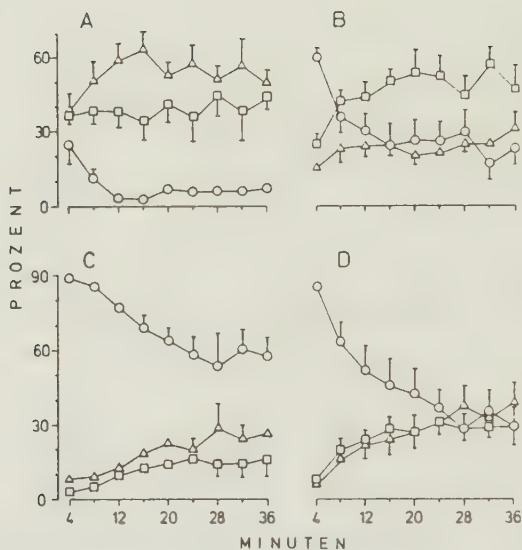


Abb.11 Anteile von NDBA und seiner Metaboliten im Plasma nach Resorption von NDBA aus durchbluteten Dünndarmschlingen in situ

Nach Kanülierung der abführenden Vene einer Jejunum- (A,B,C) bzw. Ileumschlinge (D) von ca. 10 cm Länge wurden 0,5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung mit 17,6 (A), 605 (C), bzw. 12,9 (B,D) nM 14 C-NDBA in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. In Experiment B wurde der NDBA-Lösung ausserdem 1 % Ethanol (v/v) zugesetzt. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang im Abstand von ein (erste 10 min) bis 2 min aufgefangen. In Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der prozentuale Anteil von NDBA (○), neutralen (□) und sauren (△) Metaboliten gemessen. Die Zeichenwerte entsprechen den Mittelwerten von 5 (A), 6 (B,C) bzw. 7 (D) Versuchen. Die Standardabweichung vom Mittelwert ist nur dann eingezeichnet, wenn sie mehr als die doppelte Größe des Symbols besitzt.

Nach 35-fach höherer NDBA Dosierung machten die Metaboliten im Plasma der Jejunumsegmente stets weniger als 50 % der Gesamtradioaktivität aus, d.h. mehr als die Hälfte der NDBA blieb unverändert. Der Anteil der Metaboliten war zu jedem Zeitpunkt signifikant geringer als bei der niedrigen NDBA Dosis ($p < 0,01$; Tab.7C, Abb.11C).

Im Ileum war der prozentuale Anteil der Metaboliten besonders in den ersten 4 min mit nur 14 % sehr gering. Er stieg dann aber stetig an ohne jedoch mehr als 70 % der Gesamtradioaktivität zu erreichen (Abb.11D, Tab.7D). Er war somit stets signifikant geringer als bei der niedrigen Dosis im Jejunum. Das Verhältnis saurer zu neutraler Metaboliten veränderte sich mit der Zeit derart, daß im ersten Drittel die neutralen Metaboliten überwogen, sie sich in der Versuchsmitte mit den sauren Metaboliten die Waage hielten um schließlich im letzten Drittel so wie beim Jejunum den geringeren Anteil auszumachen.

In Tabelle 8 und Abbildung 12 wird die Summe des prozentualen Anteils der Gesamtmetaboliten, der sauren und neutralen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität und der prozentuale Anteil der sauren und neutralen Metaboliten bezogen auf die Gesamtmetaboliten im Plasma nach 36 min bei den verschiedenen Versuchsbedingungen gegenübergestellt.

Im Jejunum wurde bei der niedrigen NDBA Dosis 88,2 % des NDBAs während seiner Resorption metabolisiert, wobei Säuremetaboliten den größeren Anteil, nämlich 51,3 % der Gesamtradioaktivität (58,1 % der gesamten Metaboliten) ausmachten.

Die Zugabe von 1 % Ethanol (v/v) hemmte den NDBA-Abbau, denn nur 66,9 % der Gesamtradioaktivität, weniger als bei der niedrigen NDBA Dosis ohne Ethanolzugabe entfiel auf Metaboliten. Diese Hemmung kam dadurch zustande, daß nach Ethanolzugabe mit 22,8 % der Gesamtradioaktivität weniger als halb so viel saure Metaboliten gebildet wurden und

dies nicht durch vermehrte Bildung neutraler Metaboliten, 44 % statt 37 % ohne Ethanol ausreichend aufgefangen wurde.

Bei der hohen NDBA Dosis verringerte sich im Jejunum der Prozentsatz von Metaboliten, 22,2 % der Gesamtradioaktivität, relativ zur niedrigen NDBA Dosis auf ein Viertel, wobei saure Metaboliten unverändert den größeren Anteil der gesamten Metaboliten, 13,6 % der Gesamtradioaktivität (61,0 % der Gesamtmetaboliten) ausmachten.

Die Stoffwechselkapazität von NDBA im Ileum, 40,9 % der Gesamtradioaktivität, war nur halb so hoch als im Jejunum bei ähnlich niedriger Dosis. Der Anteil der sauren Metaboliten an den Gesamtmetaboliten war mit 46,4 % deutlich niedriger als im Jejunum.

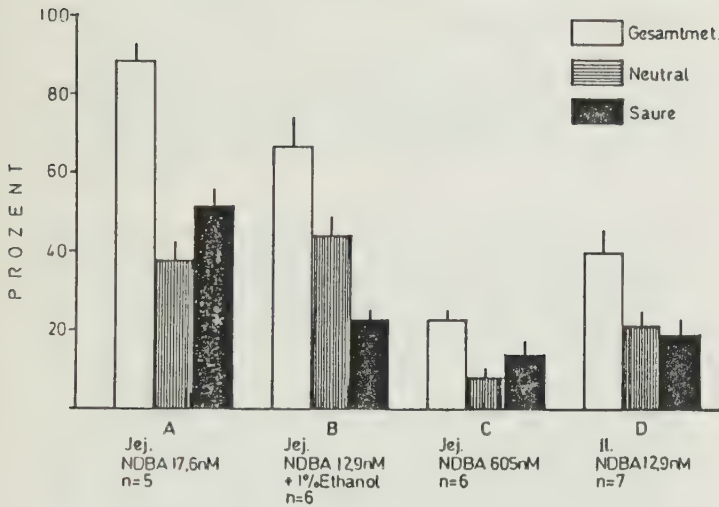


Abb.12 Summe der Gesamtmetaboliten, der sauren und der neutralen Metaboliten in Prozent der Gesamtradioaktivität im Plasma nach 36 Minuten.

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurde NDBA, gelöst in 0,9 % NaCl 0,5 ml, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. In Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Anteil von NDBA, neutralen und sauren Metaboliten gemessen. Jede Säule entspricht dem Mittelwert und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_x$).

4. DISKUSSION

4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methode

4.1.1. Untersuchungsmethode

Mit einer modifizierten Methode nach Winne und Remischovsky (78) kann die Resorption und der Stoffwechsel von NDBA in durchbluteten Darmschlingen der Ratte in situ untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Dünndarmschlingen von 8-10 cm Länge (ca. 0,5-0,7 g Feuchtgewicht), deren abführende Vene mit einer Kanüle punktiert worden war, NDBA injiziert. Das Blut aus der Vene konnte frei abfließen, der Blutverlust wurde durch Infusion von heparinisiertem Blut von Spenderraten (ca. 0,5 ml/min) in die V.jugularis substituiert und der Blutdruck auf 80-120 mm Hg gehalten. Winne et al (50,78) beschreiben, daß der Blutfluß die Resorption beeinflusst. Wenn die Menge des abfließenden Blutes aus dem Jejunum 0,6-0,7 ml/min/g feuchten Gewebes beträgt ist die Resorption optimal. In der vorliegenden Untersuchung betrug der Blutfluß 0,25-0,45 ml/min (Tab.9), das sind ca. 0,4-0,8 ml/min/g Feuchtgewicht, es waren also relativ optimale Resorptions- und Stoffwechselbedingungen gegeben.

Im Vergleich zur Methode von Fisher und Parsons mit nicht durchbluteten Darmschlingen in vitro (49,57,58) ist die vorliegende Untersuchungsmethode den normalen physiologischen Gegebenheiten erheblich angenähert. Zugleich kann mit dieser Methode Blut in kurzen Zeitabständen gesammelt und damit der zeitliche Verlauf der Resorptions- und Stoffwechselvorgänge besser analysiert werden. Mit dieser Methode wird jedoch durch die beidseitige Abbindung der

Darmschlinge die Situation eines Darmverschlusses herstellt. Obwohl die Zeitdauer der Abbindung relativ kurz ist, sollte diese Methode verbessert werden um eine noch höhere Annäherung an normale physiologische Umstände zu erreichen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, daß nur ein Versuch pro Tag möglich ist, so daß die Dauer der Versuchsreihe lange Zeit in Anspruch nimmt, Außerdem ist eine größere Menge an Tieren erforderlich, denn zusätzlich zum Versuchstier wird noch von 2-3 Ratten Spenderblut gebraucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde Urethan für die Narkose verwendet. Urethan ist als billiges und äußerst wirksames Narkosemittel für Tiere schon lange im Gebrauch (43) und soll ohne Einfluß auf Untersuchungsergebnisse am in situ perfundierten Darm sein (50). Obwohl eines Berichtes zufolge Urethan den nukleären Sauerstoffwechsel beeinflussen soll, so daß keine Zellteilung stattfindet (19), gibt es keine Erfahrungen darüber, ob Urethan die Resorption und den Stoffwechsel von NDBA im Darm ebenfalls beeinflusst. Dies könnte nur durch vergleichende Untersuchungen mit anderen Narkotika abgeklärt werden. Die gute Übereinstimmung der vorliegenden Ergebnisse zur Resorption und Verstoffwechslung von NDBA in Dünndarmschlingen von Ratten in situ mit den Ergebnissen in vitro ohne Urethanverwendung (49,57,58), die weiter unten noch ausführlich diskutiert werden soll, zeigt, daß Urethan vermutlich keinen Einfluß auf das vorliegende Ergebnis hat.

Gegen eine wesentliche Beteiligung von Darmbakterien am Nitrosaminstoffwechsel in situ sprechen die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen des NDBA-Stoffwechsels (58). Auch wäre in diesem Falle ein höherer Umsatz im stärker mit Bakterien besiedelten Ileum zu erwarten gewesen.

4.1.2. Analytische HPLC

In früheren Untersuchungen über den Nitrosaminstoffwechsel im Dünndarm fand entweder nur die Aktivierung durch alpha-Oxidation, gemessen an der Alkylierung von Nukleotiden (42,70) oder der CO_2 -Bildung (5,47), Beachtung oder der Abbau der Nitrosamine wurde indirekt gemessen, durch Bestimmung der Differenz zwischen dem Gehalt an Radioaktivität und unveränderten Nitrosamins in der resorbierten Flüssigkeit von Darmpräparationen (1,12).

Die direkte Bestimmung von NDBA und seinen Hauptmetaboliten mit Hilfe der Säulenschalttechnik, Trennung auf einer C18-Säule und Nachweis in einem Radioaktivitätsmonitor, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (49,58,81), ermöglichte eine genaue quantitative Bestimmung der Gesamtverstoffwechslung von NDBA. Wie bereits bei den in vitro Studien trennten sich die vom Darm gebildeten Metaboliten durch HPLC-Analyse in zwei Hauptfraktionen mit neutralem bzw. saurem Charakter auf. Während die saure Fraktion überwiegend aus NB3CPA besteht, enthält die neutrale Fraktion zwei Hauptbestandteile, NB4HBA und NB3HBA, die zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung durch die HPLC-Analyse noch nicht getrennt ausgewertet werden konnten. Die Untersuchung einer einzelnen Probe mit Hilfe einer gaschromatografischen Methode mit Chemoluminiszenzdetektion* ergab ein NB4HBA zu NB3HBA-Verhältnis von zwei.

* Die Untersuchung wurde freundlicherweise von Frau Gottfried-Anacker am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg durchgeführt.

4.2. Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Jejunum in situ

4.2.1. Resorption aus durchbluteten Darmschlingen in situ

In der Literatur wird von einer raschen Resorption von Nitrosaminen aus Dünndarmschlingen in vivo berichtet. Bereits 3 Minuten nach Verabreichung von 0,2-5 μ g NDMA oder NDEA, gelöst in 1 ml Kochsalzlösung, in eine abgebundene Dünndarmschlinge fanden Pegg und Perry (55) weniger als 50 % im Darmlumen wieder. Nach 10 min waren mehr als 80 % resorbiert worden. Agrelo et al. (1) kamen mit den gleichen Nitrosaminen, 1,2-60 μ g gelöst in 0,3 ml Kochsalzlösung, zu einem vergleichbaren Ergebnis, d.h. ca. 80 % der verabreichten Radioaktivität waren unabhängig von der Dosis nach 10 min aus dem Darmlumen verschwunden. Auch der Zusatz von Albumin oder Glucose beeinflusste die Resorptionsgeschwindigkeit nicht. Dagegen verzögerte sich die Resorption deutlich, wenn die Nitrosamine in einer Lipidemulsion gelöst verabreicht wurden (1).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Resorption von ^{14}C -NDBA nicht anhand seiner Verschwindensrate aus dem Darmlumen, sondern durch die Erscheinensrate der Radioaktivität im abführenden Blut der abgebundenen Schlinge in situ gemessen. Die vergleichsweise langsamere Resorption bei der niedrigen NDBA-Dosis von 17,6 nM, 50 % der verabreichten Radioaktivität waren nach 6,7 min den Jejunumschlingen resorbiert worden (Tab.4), kann deshalb verschiedene Ursachen haben. NDBA könnte z.B. zwar ebenso rasch aus dem Darmlumen verschwinden wie NDMA und NDEA aber aufgrund seiner wesentlich höheren Lipophilie langsamer in das Blut abgegeben werden.

Für diese Hypothese spricht das Ergebnis von Winne et al. (79), die 5 min nach Applikation von Salicylsäure bzw. n-Butanol in eine abgebundene Schlinge 76 % bzw. 57 % im abführenden Blut und 1,0 % bzw. 6,9 % in der Darmwand fanden. Das lipophilere Butanol war also in der Darmwand angereichert

und langsamer zur Blutseite hin abgegeben worden. Schwenk et al. (64) fanden mit der gleichen Methode für das lipophile Hormon Östron eine zu der vorliegenden Untersuchung mit NDBA vergleichbare Resorptionsrate. Die Resorptionsrate ist vom Blutfluß abhängig (50,78). Die höheren Resorptionsraten in den Versuchen von Winne (79) sind wahrscheinlich auf die höhere Durchblutung der Darmschlingen, 1,5 ml/min/g, zurückzuführen, die mehr als 3 mal über der in der Studie von Schwenk et al. (64) und unserer eigenen Untersuchung liegt.

Mit einer Verzögerungszeit von 4-5 min nach Applikation von NDBA wurde die höchste Radioaktivitätskonzentration im Blut erreicht. Dem raschen Anstieg folgt danach ein langsamerer aber stetiger Abfall der Konzentration. Der Verlauf der Kurve entspricht dem einer Bateman-Funktion, die aus einer Invasion und einer Evasion erster Ordnung resultiert (35). Bei der Resorption muß eine Substanz im wesentlichen zwei Barrieren überwinden. Zuerst muß die Substanz über die Bürstensaummembran in die Mucosazelle aufgenommen werden. Dieser Vorgang verläuft bei passiver Resorption entsprechend einer Invasion erster Ordnung. Anschließend wird die Substanz aufgrund des Konzentrationsgefälles über die Basalmembran zur Blutseite hin abgegeben, in der Regel ebenfalls mit einer Kinetik erster Ordnung. Die Veränderung der Konzentration in der Mucosazelle spiegelt sich in unserem Modell in der Konzentration des abführenden Blutes wieder.

Wesentlich langsamer war dagegen die Resorption von NDBA aus isoliert perfundierten Jejunumsegmenten. Nach zwei Stunden Perfusion waren bei vergleichbaren NDBA-Konzentrationen nur 10 % der verabreichten Radioaktivität in das Resorbat übergegangen (58). Der Abtransport von NDBA aus dem Darmgewebe ist in vitro also wegen der fehlenden Durchblutung erheblich langsamer als in vivo.

4.2.2. Metabolismus in durchbluteten Darmschlingen in situ

Obwohl bereits berichtet wurde, daß die Nitrosamine NDMA, NDEA und NPYR im Dünndarm metabolisiert werden können

(1,12,28,55), ließ sich eine quantitativ bedeutsame Rolle des Darmes erst für Nitrosamine mit längerer Alkylkette, NDPA, NDBA und NDAA, in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe nachweisen (58). NDBA wurde von isoliert perfundierten Jejunumschlingen im Konzentrationsbereich unter 10 µg/l während der Resorption zu mehr als 90 % verstoffwechselt. Es wurden drei Stoffwechselwege im Darm nachgewiesen, die α -, ω - und ω -1-Oxidation. NB3CPA, das Folgeprodukt der ω -Oxidation zu NB4HBA, war quantitativ bei weitem der bedeutendste Metabolit (49,81). Trotz der wesentlich schnelleren Resorption der Radioaktivität in situ konnten die in vitro Ergebnisse weitgehend bestätigt werden, denn 88,2 % der Radioaktivität im Plasma entfiel auf Metaboliten (Tab.10).

Tab. 10 Vergleich der Metabolisierung einer niedrigen NDBA-Dosis in Jejunumsegmenten in situ und in vitro.

In situ wurde die Aufnahme von ^{14}C -NDBA aus einer abgebandenen Jejunumschlinge in das abführende Blut 36 min lang gemessen. In vitro wurden Jejunumsegmente 2 h in einem Glasperfusator rezirkulierend mit einer ^{14}C -NDBA-Lösung perfundiert (58). Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf NDBA und seine sauren und neutralen Metaboliten wurde mittels HPLC in den Plasmaproben und Resorbaten bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten von 5-7 Einzelexperimenten.

	NDBA (µM/l)	Metaboliten- anteil (%)	<u>saure</u> neutrale Metaboliten
in vitro	12,8	94,0	8,6
in situ	35,2	88,2	1,4
in vitro	57,4	79,3	6,1

Obwohl die sauren Metaboliten auch in situ mit 58 % den Hauptanteil ausmachten (Tab.7, Abb.11), war das Verhältnis von sauren zu neutralen Metaboliten doch deutlich niedriger als in vitro (Tab.11). Nachdem eine Auftrennung der neutralen Metaboliten, NB3HBA und NB4HBA, nicht möglich war, kann die Ursache für diesen Unterschied noch nicht erklärt wer-

den. Es könnte zum einen der ω -1-Oxidationsweg zu NB3HBA in situ stärker beschritten werden. Zum anderen könnte die Verstoffwechslung von NB4HBA zu NB3CPA ein relativ langsamer Prozeß sein, der in situ durch einen raschen Abtransport des NB4HBA überlagert wird. Für die letztere der beiden Möglichkeit spricht das Ergebnis einer einzelnen Analyse der neutralen HPLC Fraktion einer Plasmaprobe durch GC-TEA, bei der doppelt soviel NB4HBA als NB3HBA nachgewiesen werden konnte (vergleiche 4.1.2.).

4.3. Resorption und Metabolismus einer hohen NDBA-Dosis im Jejunum in situ

Bei einer 35-fach höheren NDBA-Dosis war die Resorptionsgeschwindigkeit im Jejunum verlangsamt. Die Halbwertszeit für die Aufnahme der Radioaktivität verlängerte sich auf 9 min. Gleichzeitig reduzierte sich der Anteil der Metaboliten im Plasma auf 22 %, d.h. auf ein Viertel des Wertes, der mit der niedrigen Dosis erhalten worden war. Die Verstoffwechslung von NDBA erfolgt in der Darmzelle durch mikrosomale Enzyme, deren Aktivität von der Konzentration des Substrats abhängig ist. Die Kapazität der Enzyme ist jedoch begrenzt. Bei der hohen Konzentration ist offensichtlich eine Sättigung eingetreten, die sich in dem verringerten prozentualen Anteil der Metaboliten an der gesamt resorbierten Radioaktivität ausdrückt.

Der Vergleich mit den Ergebnissen an isoliert perfundierten Jejunumsegmenten in vitro zeigt erneut eine gute Übereinstimmung der Metabolisierungsraten (Tab.11). Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß innerhalb des in situ untersuchten Konzentrationsbereiches von 25-1200 µg/l das Ausmaß der präsystemischen NDBA-Verstoffwechslung offensichtlich nicht von der Resorptionsgeschwindigkeit, sondern nur von der Substratkonzentration abhängt. Die verlangsamte Aufnahmegeschwindigkeit der Radioaktivität in situ bei der hohen Dosis könnte in dem langsameren Abtransport des lipophilen NDBA im Vergleich zu seinen hydrophileren Metaboliten begründet sein.

Tab. 11 Vergleich der Metabolisierung einer hohen NDBA-Dosis
in Jejunumsegmenten in situ und in vitro.

In situ wurde die Aufnahme von ^{14}C -NDBA aus einer abgebandenen Jejunumschlinge in das abführende Blut 36 min lang gemessen. In vitro wurden Jejunumsegmente 2 h in einem Glasperfusator rezirkulierend mit einer ^{14}C -NDBA-Lösung perfundiert (58). Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf NDBA und seine sauren und neutralen Metaboliten wurde mittels HPLC in den Plasmaproben und Resorbaten bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten von 5-7 Einzelexperimenten.

	NDBA ($\mu\text{M}/\text{l}$)	Metaboliten- anteil (%)	<u>saure</u> <u>neutrale</u>	Metaboliten
in vitro	730	28,9	3,7	
in situ	1210	22,2	1,6	

Auch in vitro war bei der hohen NDBA Dosis eine stärkere Anreicherung von Radioaktivität im Darmgewebe (9 % gegenüber 3 % der Dosis) und ein geringerer Übergang in das Resorbat (2,4 % statt 10 % der Dosis) gesehen worden (58).

4.4. Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Ileum in situ

Aus Tab.3 ist ersichtlich, daß bei den Versuchen mit Ileumsegmenten insgesamt nur 63,4 % der Dosis im Blut, Darmlumen und Darmgewebe wiedergefunden wurden. Die Ursache könnte in eine fehlerhaften Bestimmung der applizierten Dosis liegen, es könnte aber auch sein, daß ein Teil der Radioaktivität über das Lymphsystem resorbiert wurde (22) oder die Darmwand über die Serosaseite verlassen hat und dort von der das Segment befeuchtenden Gaze aufgenommen wurde (79). Weder im systemischen Blut noch in der Gaze ließ sich jedoch Radioaktivität nachweisen. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die Aufnahme geringer Mengen über die Lymphe in das Blut bedingt, durch den starken Verdünnungseffekt und eine rasche Ausscheidung über die Nieren, nicht nachzuweisen wäre.

Die Aufnahmegeschwindigkeit für Radioaktivität war bei den Ileumschlingen am geringsten, die Halbwertszeit betrug 10,3 min. Der Anteil von nicht verstoffwechseltem NDBA im Plasma war zu Beginn genauso hoch wie bei der hohem Konzentration im Jejunum. Die Metabolisierung nahm dann aber schneller zu und überschritt nach 12-16 min die 50 % Marke so daß am Ende der Gesamtanteil der Metaboliten im Plasma fast doppelt so hoch war wie bei der hohen Konzentration im Jejunum, aber immer noch halb so hoch wie bei der niedrigen Konzentration im Jejunum. Eine Abnahme der Stoffwechselkapazität im Dünndarm mit zunehmender Distanz vom Pylorus wurde auch für andere Substrate gefunden (76).

Der Anteil saurer Metaboliten an den Gesamtmetaboliten war im Ileum deutlich geringer als im Jejunum und hielt sich etwa mit dem der neutralen Metaboliten die Waage. Die Frage, ob dieser Unterschied auf einer geringeren ω -Oxidation und damit einer vermehrten Bildung anderer neutraler Metaboliten anstelle von NB4HBA beruht, oder auf einer verringerten Autoxidation des NB4HBA zu NB3CPA, kann aus dem vorliegenden Untersuchungsmaterial nicht beantwortet werden.

Der Vergleich mit den in vitro Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (58) zeigt, daß die Gesamtverstoffwechslung von NDBA auch im Ileum gut mit den in situ Ergebnissen übereinstimmt. Auch das Verhältnis saurer zu neutraler Metaboliten ist bei beiden Untersuchungsmethoden vergleichbar (Tab.12).

Tab. 12 Vergleich der Metabolisierung einer niedrigen NDBA-Dosis in Ileumsegmenten in situ und in vitro.

In situ wurde die Aufnahme von ^{14}C -NDBA aus einer abgebandenen Ileumschlinge in das abführende Blut 36 min lang gemessen. In vitro wurden Ileumsegmente 2 h in einem Glasperfusator rezirkulierend mit einer ^{14}C -NDBA-Lösung perfundiert (58). Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf NDBA und seine sauren und neutralen Metaboliten wurde mittels HPLC in den Plasmaproben und Resorbaten bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten von 5-7 Einzelexperimenten.

	NDBA ($\mu\text{M/l}$)	Metaboliten- anteil (%)	saure neutrale	Metaboliten
in vitro	11,7	56,2	1,1	
in situ	25,8	40,9	0,9	
in vitro	57,4	26,9	1,7	

4.5. Einfluß von Ethanol auf Resorption und Metabolismus einer niedrigen NDBA-Dosis im Jejunum in situ

Der Zusatz von 1 % Ethanol reduzierte die Verstoffwechslung von NDBA zu sauren Metaboliten. Dieser Effekt wurde nicht durch die leicht vermehrte Bildung von neutralen Metaboliten aufgefangen, so daß der Gesamtanteil der Metaboliten im Plasma von 88 % bei den Kontrollen unter Ethanoleinfluß auf 67 % absank. Mit der geringeren Verstoffwechslung von ^{14}C -NDBA ging erneut eine Verlangsamung der Aufnahmeschwindigkeit für die Gesamtradioaktivität einher. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, daß das lipophilere NDBA langsamer vom Darmgewebe in das Blut abgegeben wird als seine hydrophileren Metaboliten (vergleiche 4.3.). Auch in isoliert perfundierten Jejunumsegmenten in vitro wurde der hemmende Einfluß von Ethanol auf den Transport und Metabolismus von NDBA beobachtet (49). Die Bildung saurer Metaboliten wurde bereits bei einer Ethanolkonzentration von 0,06 % signifikant gehemmt, der Transport der Gesamtradioaktivität erst bei einer Konzentration von > 0,5 %.

Der Wirkungsmechanismus der Hemmung durch Ethanol ist noch ungeklärt. Es liegt aber nahe, daß Ethanol Enzyme, welche für die Aufoxidation von NB4HBA zu NB3CPA verantwortlich sind, kompetitiv hemmt. In akuten Versuchen wurde in der Leber eine Hemmung der mikrosomalen NDMA-Demethylase durch Ethanol beobachtet (26,63). Dagegen führte die chronische Behandlung von Ratten zu einer Induktion der NDMA-Demethylase (63). Mikrosomen des Rattendarms setzten NDBA nur zu den Hydroxiden NB4HBA und NB3HBA um. Eine Aufoxidierung zu NB3CPA konnte nicht nachgewiesen werden (39,54). Diese Reaktion fand erst statt, wenn zusätzlich cytosolische Enzyme vorhanden waren (39). Versuche mit N-Nitrosodiethanolamin haben ergeben, daß die ADH aus Hefe in der Lage ist, dieses Nitrosamin aufzuoxidieren (16). In Vorversuchen konnten wir unter den gleichen Bedingungen keine Umsetzung von NB4HBA durch diese ADH beobachten. Auch die Hemmung der ADH im Dünndarm der Ratte durch Vorbehandlung mit Pyrazol (38) führte zu keiner nennenswerten Veränderung von Transport und Stoffwechsel des NDBA in isoliert perfundierten Jejunumsegmenten (Richter, nicht veröffentlicht). Angesichts der großen Unterschiede zwischen der Ethanolkonzentration ($1\% = 172\text{ mM/l}$) und der NDBA-Konzentration ($25,8\text{ }\mu\text{M/l}$) ist es jedoch denkbar, daß durch Ethanol auch andere, für den Ethanolabbau unspezifische und quantitativ unbedeutende enzymatische Reaktionen, die für die Aufoxidation von NB4HBA verantwortlich sind, kompetitiv gehemmt werden.

4.6. Toxikologische Bedeutung der präsystemischen Verstoffwechselung von NDBA im Dünndarm

Die vorliegende Untersuchung hat ergeben, daß nach oraler Aufnahme geringer, umweltrelevanter NDBA-Konzentrationen im ppb-Bereich mit einem nahezu vollständigen Abbau des NDBA im Rattendarm zu rechnen ist. Dieser präsystemische Metabolismus führt jedoch nicht zu einer Entgiftung, sondern durch omega-Oxidation zu NB4HBA und dessen nachfolgender Aufoxidation im Darm selbst oder in der Leber (29) zum Harnblasencarcinogen NB3CPA. Durch die Bevorzugung der

omega-Oxidation unterscheidet sich der NDBA-Stoffwechsel im Darm ganz wesentlich von jenem in der Leber, in der NDBA hauptsächlich am alpha- und am omega-1-C-Atom hydroxyliert wird (68). Der Dünndarm könnte deshalb eine wichtige Rolle in der Auslösung von Harnblasentumoren nach oraler NDBA-Verabreichung spielen. Die von Druckrey et al. (14) beobachtete Abnahme der Inzidenz von Lebertumoren mit gleichzeitiger Zunahme der Häufigkeit von Harnblasentumoren nach Verfütterung von abnehmenden Dosen von NDBA, könnte mit einem zunehmenden Anteil des Darmmetabolismus am Gesamtstoffwechsel des NDBA erklärt werden. Unsere Versuche mit einer niedrigen und einer hohen NDBA-Dosis haben deutlich die Begrenzung der Stoffwechselkapazität des Dünndarms aufgezeigt. Die geringere Aktivität im Ileum dürfte dagegen in jedem Falle ausreichen um nicht resorbierte Restmengen von NDBA, die die tieferen Darmabschnitte erreichen zu verstoffwechseln.

Ethanol hemmt in einer Konzentration wie sie nach Genuß alkoholischer Getränke auch im menschlichen Dünndarm vorkommt (49) die Verstoffwechslung von NDBA zu sauren Metaboliten. Dies könnte bedeuten, daß sich im Tumorexperiment bei gleichzeitiger oraler Gabe von NDBA und Ethanol die Inzidenz von Harnblasentumoren verringert. Gleichzeitig müßte aber mit einer gesteigerten Tumorzinzidenz in anderen Zielorganen von NDBA, z.B. der Leber und dem Ösophagus, gerechnet werden. Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Frage der Wechselwirkung von Ethanol und Carcinogenen beschäftigt (Übersicht bei Seitz, 65). In den meisten Fällen steigerte Ethanol die Tumorzinzidenz. Mit NDMA wurde allerdings in einem Teil der Untersuchungen eine Abschwächung der tumorigenen Wirkung gesehen. Es wäre deshalb verfrüht aufgrund der Befunde am isolierten Darm dem Ethanol einen Schutzeffekt gegenüber NDBA zuzusprechen.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material

5.1.1. Versuchstiere

Weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 300-350 g (Südd. Versuchstierfarm, Tuttlingen) wurde 18 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter (Alma A 1003, Botzenhardt, Kempten) entzogen. Während dieser Zeit hatten die Tiere freien Zugang zum Trinkwasser.

Zur Gewinnung von Spenderblut wurden männliche Ratten von 400-500 g/kg Körpergewicht herangezogen.

5.1.2. Reagenzien

Sämtliche Reagenzien sind, wenn nicht anders angegeben, von p.a. Qualität und stammen von der Fa. Merk, Darmstadt.

Alle Lösungen wurden mit Aqua tridest hergestellt.

5.1.2.1. Resorptionsversuche mit durchbluteter Darmschlinge

a. Nitroso-di-n-butylamin (Abb.2)

Molekulargewicht 158.2

- ^{14}C NDBA = 1- ^{14}C -N-Nitroso-di-n-butylamin

Spezifische Aktivitäten 24,9 bzw. 30 mCi/mmol;
Reinheit 99 % (Dr. Wessler, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).
Stammlösung in Methanol.

- NDBA "kalt" ISOPAC N5132 (Sigma Chemia GmbH, München).
Stammlösung in Methanol.

Beide Stammlösungen wurden für die Versuche mit steri-
ler physiol. Kochsalzlösung verdünnt. In einer Ver-
suchsserie wurde Ethanol zugesetzt. Folgende NDBA-Men-
gen wurden in 0,5 ml Volumen für die Versuche verwen-
det (Tab.13):

Tab. 13 NDBA-Dosierungen

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM/0,5 ml)	17,6	12,9	605	12,9
Spezifische Aktivität (mCi/mmol)	24,9	30	24,9	30
Radioaktivität (dpm/0,5 ml)	973128	862033	3241200	862033
Methanol Gehalt (%, v/v)	0,19	0,08	1,15	0,08
Ethanol Gehalt (%, v/v)	-	1,0	-	-

- b. Ethanol 20, μ l/2 ml NDBA-Lösung für Versuch B. Ethanol
Konzentration 1 % (v/v).
- c. Physiologische Kochsalzlösung, 50 ml, Fresenius AG,
Bad Homburg.
- d. Heparin Natrium 25000 I.E/5 ml, B.Braun, Melsungen AG,
3508 Melsungen.
- e. Expafusin, Pfrimmer u. Co., Pharmazeutische Werke,
Erlangen GmbH, davon 20 ml in 80 ml Rattenblut.
Konzentration 20 % (v/v).

5.1.2.2.HPLC

a. Acetonitril

b. Ethanol

c. Methanol

d. 2-Propanol

e. Puffer 1:

A: 0,1 mol/l Citronensäuremonohydrat

B: 0,2 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat

für 1 Liter: 988 ml Lösung A und 12 ml Lösung B. pH 2.

f. Puffer 2:

7 mol/l Ammoniumcarbaminat

15 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat

für 1 Liter Aqua tridest, pH 6,8.

5.1.2.3.Radioaktivitätsmessung

Omni-Szintisol^R

5.2. Methoden

5.2.1. Untersuchungsmethoden

Die Untersuchungsmethode wurde entsprechend der Methode von Winne (78) modifiziert (Abb.12).

5.2.1.1.Geräte

a. Ratten-OP-Tisch, thermostatisiert.

b. Thermostat FS (Haake, Berlin, Karlsruhe).

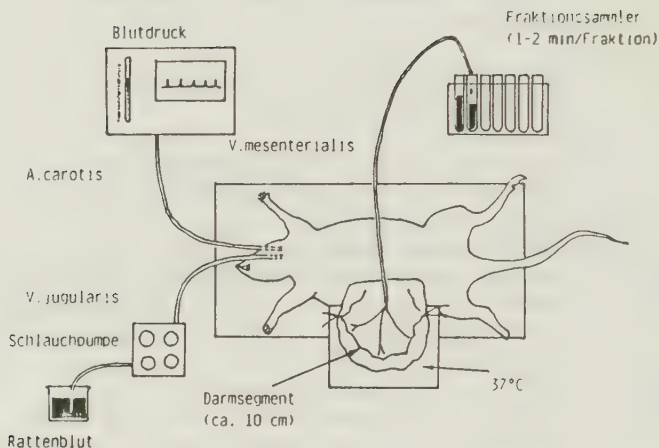
c. Schlauchpumpe 2120 (LKB Bromma, Schweden).

- d. Zentrifuge, Minifuge 4400, (Heraeus Christ GmbH, Osterode).
- e. P 23 Series Pressure Transducers (Gold Statham Instruments Inc. USA).
- f. Meß- und Registrierschrank für Blutdruck, Blutfluß und EKG (Hellige GmbH, Freiburg).
- g. Polyethylen-Katheter Innendurchmesser 0,51 mm, Außendurchmesser 1,19 mm (Portex, England).
- h. Modifizierte Katheter für die Punktion der V. jejunalis. Das vordere Ende einer Kanüle (23 G; Braun, Messungen), ca. 1 cm, wurde zur Hälfte in den Polyethylenkatheter gesteckt.

5.2.1.2.Operation

Die Ratten wurden mit Urethan (0,8 g/kg, i.p.) betäubt. Die Bauchhöhle wurde in der Mittellinie eröffnet. Eine geeignete 8-10 cm lange Jajunum- bzw. Ileumschlinge wurde auf eine thermostatisierte Platte vorgelagert, in Zellstoff eingehüllt und mit phys. Kochsalzlösung feucht gehalten. Die zur Schlinge gehörende Vene wurde mit einem Seidenfaden umschlungen, anschließend mit der Kanülenspitze des Polyethlenschlauches punktiert und eingebunden. Das Blut aus V. Jejunalis muß jetzt frei abfließen. Das Darmsegment wurde proximal und distal der zugehörigen Gefäßarkade abgebunden. Nach 3-5 Minuten wurden 0,5 ml der NDBA-Lösung in die Schlinge injiziert (Abb.13).

Das abtropfende Blut wurde im Abstand von ein (erste 10 Minuten) bis zwei Minuten insgesamt 36 Minuten lang gesammelt. Jede Blutprobe wurde gewogen und ein Aliquot für die Radioaktivitätsmessung entnommen und das restliche Blut zur Gewinnung des Plasmas anschließend zentrifugiert.



Schematische Darstellung der Autoperfusion

Abb.13 Versuchsschema für durchblutete Dünndarmschlingen in situ

Die Ratte liegt in Urethannarkose auf einem gewärmten Operationstisch. Die abgebundene Schlinge ist auf ein gewärmtes Tischen außerhalb der Bauchhöhle vorgelagert und wird mit Zellstoff feucht gehalten. Etwa 5 Minuten nach Katheterisierung der abführenden Vene wird eine Nitrosaminlösung in das Segment injiziert und das abtropfende Blut aufgefangen. Über die V. jugularis wird auf 37 °C gewärmtes, frisches Blut, verdünnt mit 20 % Expafusin^R (v/v), substituiert. In der A. carotis wird der Blutdruck kontrolliert. Die Versuchsdauer beträgt 36 Minuten.

Der Blutverlust wurde kontinuierlich durch Infusion von heparinisiertem Blut von Spenderratten (ca. 0,5 ml/min) in die V. Jugularis substituiert. Der Blutdruck wurde in der A. Carotis kontrolliert (80-120 mm Hg).

Am Versuchsende wurde das Darmsegment mit 1 ml Kochsalzlösung gespült. Die Darmspülflüssigkeit und das Darmsegment wurden gewogen. Die Länge des Darmsegments wurde gemessen. Das Darmsegment wurde mit Wasser homogenisiert und auf ein Gesamtvolumen von 5 ml gebracht.

5.2.2. HPLC

5.2.2.1. Geräte

- a. Ampullen N 11-I
Macherey-Nagel, Düren.
- b. Bördelkappen N 11 TB/OA
Macherey-Nagel, Düren.
- c. HPLC-Autosampler Sph 125
GynkoteK, München.
- d. Column Switching Module
GynkoteK, München.
- e. Gradient Former Model 250 B
GynkoteK, München.
- f. HPLC-Pumpe Model 300 B
GynkoteK, München.
- g. HPLC-Pumpe Model 600/200
GynkoteK, München.
- h. Fraktionssammler, Frac-100
Pharmacia, Uppsala.

- i. Radioaktivitäts-HPLC-Detektor IM 2000 mit Apple II europlus und Matrixdrucker Epson 82F/T Isomess, Straubenhardt.
- j. HPLC-Trennsäule 4,6 x 125 mm, gefüllt mit Shandon ODS 5 μ m als Sorbens.
Bischoff Analystechnik, Leonberg.
- k. HPLC-Vorsäulenkartuschen 4,6 x 200 mm, gefüllt mit Shandon ODS 5 μ m als Sorbens.
Bischoff Analystechnik.
- l. HPLC-Konzentrierungssäule 4,6 x 50 mm, gefüllt mit Nucleosil RP18 30 μ m
Bischoff Analystechnik.

5.2.2.2. Analytik

Das Plasma von je 4 Minuten Sammelzeit wurde für die HPLC-Analyse vereinigt und mit einem Puffer (pH 2) ebenso wie 0,4 ml der Spülflüssigkeit auf ein Gesamtvolumen von 1,25 ml gebracht. 1 ml von den Proben wurde mit Hilfe einer automatisierten HPLC-Vorsäulentechnik (Abb.14) chromatografiert. Die Proben wurden zunächst auf eine Konzentrierungssäule gebracht und 4 Minuten mit dem pH 2 Puffer (0,5 ml/min) gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde im Fraktionssammler in Szintillationsgefäßen zur Bestimmung der nicht zurückgehaltenen Radioaktivität aufgefangen. Die Trennung der zurückgehaltenen Radioaktivität erfolgte auf einer analytischen Säule (20 + 125 x 4,6 mm mit Shandon ODS 5 μ m) mit einem Gemisch aus Puffer (pH 7) und Methanol/2-Propanol (6:4), 1 ml/min, beginnend mit 10 % Alkoholanteil, der im Lauf der Analyse mittels Gradientenformer bis auf 90 % angehoben wurde (Abb.13). Der Nachweis erfolgte durch einen Radioaktivitätsdetektor. Die Retentionszeiten betrugen 14 min (NDBA), 10 min (Metaboliten mit Hydroxylgruppen) und 5 min (Metaboliten mit Carboxylgruppe). Die von der Konzentrierungssäule nicht

zurückgehaltene Radioaktivität in der Waschflüssigkeit wurde der Metabolitenfraktion zugerechnet.

5.2.3. Messung der Radioaktivität

5.2.3.1. Geräte

- a. Kunststoffzählflaschen Polyvials 714, 22 ml
Zinsser, Frankfurt.
- b. Kunststoffzählflaschen Minivials 88, 5,5 ml
Zinsser, Frankfurt.
- c. Flüssigkeitsszintillationszähler
LKB, München

5.2.3.2. Analytik

- a. Die Gesamtradioaktivität wurde in 10 µl der Vollblutproben und je 200 µl der Spülflüssigkeit und des Darmhomogenats in Kunststoffzählflaschen (Polyvials) mit 10 ml Omni-Szintisol^R bestimmt.
- b. Jeweils 0,1 ml der HPLC-Proben wurde in Kunststoffzählflaschen (Minivials) gegeben und 5 ml Omni-Szintisol^R zugesetzt.
- c. Jeweils 0,5 ml der Waschflüssigkeit von der HPLC-Konzentrierungssäule wurde in Kunststoffzählflaschen (Polyvials) gegeben und 10 ml Omni-Szintisol^R zugesetzt.

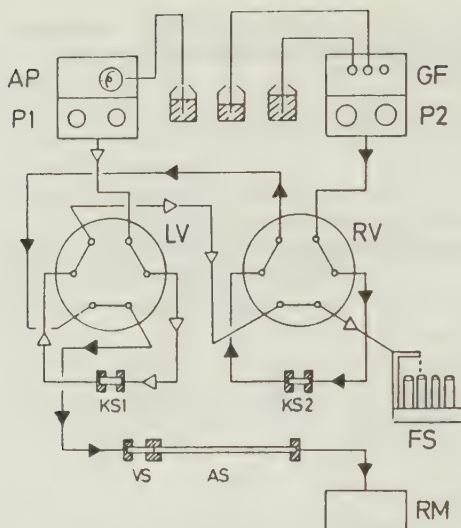


Abb. 14 Automatische HPLC-Analyse mit Säulenschaltung

Es werden 2 HPLC-Pumpen benötigt. Die erste Pumpe (P1) befördert die Probe aus der Probenschleife des automatischen Probengebers (AP) mit Hilfe eines sauren Puffers (pH 2) auf die Konzentrierungssäule. Die zweite Pumpe (P2) eluiert die Probe von der Konzentrierungssäule auf die analytische Säule mit einem vom Gradientenformer (GF) gelieferten Laufmittelgemisch mit neutralem pH. Die beiden Ventile des Vorsäulenschaltmoduls werden gleichzeitig geschaltet, so daß jeweils eine Vorsäule beladen (hier: KS1; offene Dreiecke) und die nicht zurückgehaltene Radioaktivität im Fraktionssammler (FS) aufgefangen wird, während die andere Vorsäule (hier: KS2; geschlossene Dreiecke) auf die analytische Säule (AS) eluiert und das Chromatogramm im Radioaktivitätsmonitor (RM) aufgezeichnet wird. Nach Umschalten der Ventile wird KS1 eluiert und KS2 nach einer Konditionierungszeit mit einer neuen Probe beladen.

- P1,P2: HPLC-Pumpen 300B bzw. 600/200, Gynkotec
 AP : Automatischer Probengeber sph 125, Gynkotec
 GF : (Niederdruck-)Gradientenformer 250B, Gynkotec
 RM : Radioaktivitätsmonitor IM 2000, Isomess
 FS : Fraktionssammler Frac-100, Pharmacia
 LV,RV: Linkes und rechtes Ventil des Säulenschaltmoduls SE 2, Gynkotec
 KS : Konzentrierungssäule, HPLC-Kartusche, 5 x 4,6 mm mit Nucleosil 30 C18, 30,um, Gynkotec
 VS : Vorsäule, HPLC-Kartusche, 20 x 4,6 mm mit Shandon Hypersil ODS 5,um, Gynkotec
 AS : Analytische Säule, 125 x 4,6 mm mit Shandon Hypersil ODS 5,um, Gynkotec

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Agrelo, C., Phillips, J.C. Lake, B.G., Longland, R.C. and Gangolli, S.D.:
Studies on the gastrointestinal absorption of N-nitrosamines: effect of dietary constituents.
Toxicology, 10:159-167, (1978).
2. Arcos, J.C., Davies, D.L., Brown, Ch.E.L. and Argus, M.F.:
Repressible and inducible enzymic forms of dimethyl-nitrosamine-demethylase.
Z.Krebsforsch., 89:181-199, (1977).
3. Autrup, H., Harris, C.C. and Trump, B.F.:
Metabolism of acyclic and cyclic N-nitrosamines by cultured human colon.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 159:111-115, (1978).
4. Bartsch, H. and Montesano, R.
Commentary: Relevance of nitrosamines to human cancer.
Carcinogenesis, 5:1381-1393, (1984).
5. Bartsch, H., Malaveille, C. and Montesano, R.:
In vitro metabolism and microsome-mediated mutagenicity of dialkylnitrosamines in rat, hamster, and mouse tissues.
Cancer Res., 35:644-651, (1975).
6. Blattmann, L. and Preussmann, R.:
Oxidative biotransformation of di-n-butyl nitrosamine.
Formation in vitro of aldehydes in the presence of rat liver microsomes.
Z.Krebsforsch., 88:311-314, (1977).
7. Blattmann, L. und Preussmann, R.:
Biotransformation von carcinogenen Dialkylnitrosaminen.
Weitere Urinmetaboliten von Di-n-butyl- und Di-n-pentyl-Nitrosamin.
Z.Krebsforsch., 81:75-78, (1974).
8. Blattmann, L. und Preussmann, R.:
Metaboliten von (2-Hydroxybutyl)-n-butyl nitrosamin im Rattenurin.
Z.Krebsforsch., 83:125-127 (1975).
9. Blattmann, L., Joswig, N. und Preussmann, R.:
Struktur von Metaboliten des carcinogenen Methyl-n-butyl nitrosamins im Rattenurin.
Z.Krebsforsch., 81:71-73, (1974).

10. Brittebo, E.B., Löfberg, B. and Tjälve, H.:
Sites of metabolism of N-nitrosodiethylamine in mice.
Chem.Biol.Interact., 34:209-221, (1981).
11. 陈国楨, 钟学礼, 黄铭新, 李荣明:
食管癌, 306页, 胃癌, 326页,
内科学, 陈国楨主编, 第2版, 人民卫生出版社, 北京, 1984年
12. Cottrell, R.C., Young, P.J., Walters, D.G., Phillips, J.C.,
Lake, B.G. and Gangolli, S.D.:
Studies of the metabolism of N-nitrosopyrrolidine in the
rat.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 51:101-106, (1979).
13. Deitrich, R.A. and Erwin, V.G.:
Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in
vivo by disulfiram and diethyldithiocarbamate.
Mol.Pharmacol., 7:301-307, (1971).
14. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. and Schmähel, D.:
Organotrope Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-
Verbindungen an BD-Ratten.
Z.Krebsforsch., 69:103, (1967).
15. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, C.H.,
Mennel, H.D. und Stahl, K.W.:
Selective Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch
Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol(4)-nitrosamin.
Z.Krebsforsch., 66:280-290, (1964).
16. Eisenbrand, G., Denkel, E. and Pool, B.:
Alcoholdehydrogenase as an activating enzyme for
N-nitrosodiethanolamine (NDELA): In vitro activation of
NDELA to a potent mutagen in Salmonella typhimurium.
J.Cancer Res.Clin.Oncol., 108:76-80, (1984).
17. Eisenbrand, G., Spiegelhalder, B. and Preussmann, R.:
Nitrate and nitrite in saliva.
Oncology, 37:227-231, (1980).
18. Fine, D.H., Ross, R., Rounbehler, D.P., Silvergleid, A. and
Song, L.:
Formation in vivo of volatile N-nitrosamines in man after
ingestion of cooked bacon and spinach.
Nature, 265:735-755, (1977).

19. Goodman, L.S. and Gilman, A.:
Urethan, P.1427, in:
The pharmacological basis of therapeutics by Goodman, L.S.
and Gilman, A., second Edition, The Macmillan Company in New
York, (1955).
20. Gough, T.A., Webb, K.S. and Coleman, R.F.:
Estimate of the volatile nitrosamine content of UK food.
Nature, 272:161-163, (1978).
21. Graddock, V.M.:
Nitrosamines and human cancer: proof of association?
Nature, 306:638, (1983).
22. Grimus, R.C. and Schuster, I.:
The role of the lymphatic transport in the enteral
absorption of naftifine by the rat.
Xenobiotica, 4:287-294, (1984).
23. Habs, M. and Schmähl, D.:
Inhibition of the hepatocarcinogenic activity of
diethylnitrosamine (DENA) by ethanol in rats.
Hepato-Gastroenterol., 28:242-244, (1981).
24. Hashimoto, Y. and Kitagawa, H.:
In vitro neoplastic transformation of epithelial cells of
rat urinary bladders by nitrosamines.
Nature, 252:479-499, (1974).
25. Hashimoto, Y., Suzuki, E. and Okada, M.:
Induction of urinary bladder tumors in ACI/N rats by
butyl(3-carboxypropyl)nitrosamine, a major urinary
metabolite of butyl(4-hydroxybutyl)nitrosamine.
Gann, 63:391-392, (1972).
26. Hauber, G., Frommberger, R., Remmer, H. and Schwenk, M.:
Metabolism of low concentrations of N-nitrosodimethylamine
in isolated liver cells of the guinea pig.
Cancer Res., 44:1343-1346, (1984).
27. Hawksworth, G.M. and Hill, M.J.:
Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines.
Br.J.Cancer, 25:520-526, (1971).
28. Huber, K.W. and Lutz, W.K.:
Methylation of DNA in stomach and small intestine of rats
after oral administration of methylamine and nitrite.
Carcinogenesis, 5:1729-1732, (1984).

29. Irving, C.C. and Daniel, D.S.:
Effect of disulfiram (DSF) on the metabolism of N-butyl-N-(4-hydroxy-(1-¹⁴C)-butyl)nitrosamine ((¹⁴C)-BHBN).
AACR Abstracts, Nr.449, (1984).
30. Irving, C.C., Tice, A.J. and Murphy, W.M.:
Inhibition of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine induced urinary bladder cancer in rats by administration of disulfiram in the diet.
Cancer Res., 39:3040-3043, (1979).
31. Ivancovic, S. and Druckrey, H.:
Transplacentare Erzeugung maligner Tumore.
Z.Krebsforsch., 71:320-360, (1968).
32. Jamin, G. and Cha, J.W.:
Renal adenomas induced in rats by dimethylnitrosamine.
Arch.Path., 87:267-278, (1969).
33. Julkunen, R.J.K., Padova, C.D. and Lieder, C.S.:
First pass metabolism of ethanol - a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol.
Life Sci., 37:567-573, (1985).
34. Kakizoe, T., Wang, T.T., Eng, V.W.S., Furrer, R., Dion, P. and Burce, W.R.:
Volatile N-nitrosamines in the urine of normal donors and of bladder cancer patients.
Cancer Res., 39:829-832, (1979).
35. Kurz, H.
Elimination von Pharmaka durch Stoffwechsel
(Biotransformation) S.40-50 in:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Herausgegeben von Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W.
3. Auflage, Wissenschaftsverlag, Mannheim, (1980).
36. Lai, D.Y. and Arcos, J.C.:
Dialkylnitrosamine bioactivation and carcinogenesis.
Life Science, 27:2149-2165, (1980).
37. Lake, B.G., Phillips, J.C., Heading, C.E. and Gangolli, S.D.:
Studies on the in vitro metabolism of dimethylnitrosamine by rat liver.
Toxicology, 5:297-309, (1976).

38. Lamboeuf, Y., De Saint Blanquat, G.S. and Derache, R.:
Mucosal alcohol dehydrogenase- and aldehyde dehydrogenase
mediated ethanol oxidation in the digestive tract of the
rat.
Biochem.Pharmacol., 30:542-545, (1981).
39. Lehmann, G., Zwickenspflug, W. and Richter, E.:
Comparison of the in vitro metabolism of N-nitrosodibutyl-
amine (NDBA) in rat liver and small intestine.
Int.Symposium on Clinical and Basic Aspects of Enzyme
Induction and Inhibition, Essen, 5.-6. 7. (1985).
40. Magee, P.N. and Barnes, J.M.:
The production of malignant primary hepatic tumours in the
rat by feeding dimethylnitrosamine.
Br.J.Cancer, 10:114-122, (1956).
41. Maling, H.M., Stripp, B., Sipes, I.G., Highman, B., Saul, W. and
Williams, M.A.:
Enhanced hepatotoxicity of carbon tetrachloride, thioacetamide
and some comparison with potentiation by isopropanol.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 31:291-308, (1975).
42. Margison, G.P., Swindell, J.A., Ockey, C.H. and Craig, A.W.:
The effects of a single dose of dimethylnitrosamine in the
chinese hamster and the persistence of DNA alkylation
products in selected tissues.
Carcinogenesis, 1:91-95, (1980).
43. Meyer, H.H. und Gottlieb, R.:
Urethan, Seite 121 in:
Die experimentelle Pharmakologie als Grundlage der
Arzneibehandlung von Meyer, H.H. und Gottlieb, R., Siebente
neubearbeitete Auflage, Urban u. Schwarzenberg, (1925).
44. Miller, K.W. and Yang, C.S.:
Studies on the mechanism of induction of N-nitrosodi-
methylamine demethylase by fasting, acetone, and ethanol.
Arch.Biochem.Biophys., 229:483-491, (1984).
45. Mirvish, S.S.:
Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and
in vivo occurrence.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 31:325-351, (1975).
46. Mirvish, S.S., Wang, M.Y., Smith, J.W., Deshpande, A.D.,
Makary, M.H. and Issenberg, P.:
 β - to ω -hydroxylation of the esophageal carcinogen
methyl-N-aminonitrosamine by the rat esophagus and related
tissues.
Cancer Res., 45:577-583, (1985).

47. Montesano, R. and Magee, P.N.:
Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man.
IARC Sci. Publ., 10:39-56, (1974).

48. Murphy, G.P., Mirand, E.A., Johnston, G.S., Schmid, J.D. and Scott, W.W.:
Renal tumors induced by a single dosis of dimethylnitrosamine: Morphologic, functional, enzymatic and hormonal characterizations.
Invest Urol., 4:39-56, (1966).

49. Neiss, J.:
Hemmung des intestinalen Metabolismus von Dibutylnitrosamin durch Ethanol bei der Ratte.
Diss.med.vet.München (1985).

50. Ochsenfahrt, H. and Winne, D.:
The influence of blood flow on the absorption of drugs from the jejunum of the rat.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 264:55-75, (1969).

51. Okada, M. and Ishidate, M.:
Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine and its analogues. Selective induction of urinary bladder tumours in the rat.
Xenobiotica, 7:11-24, (1977).

52. Okada, M. and Suzuki, E.:
Metabolism of butyl(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats.
Gann, 63:391-392, (1972).

53. Österdahl, B.G.:
N-nitrosamines and nitrosatable compounds in rubber nipples and pacifiers.
Chem.Toxicol., 21:755-757, (1983). Fo

54. Pacifici, G.M., Richter, E., Lehmann, G., Wiessler, M., Zwickpflug, W. and Giuliani, L.:
Hydroxylation of dibutylnitrosamine in the human liver and intestinal microsomal fractions.
Arch.Toxicol., 58:196-198, (1986).

55. Pegg, A.E. and Perry, W.:
Alkylation of nucleic acids and metabolism of small dosis of dimethylnitrosamine in the rat.
Cancer Res., 41:3128-3132, (1981).

56. Powis, G.:
Effect of a single oral dose of methanol, ethanol and
propan-2-ol on the hepatic microsomal metabolism of foreign
compounds in the rat.
Biochem.J., 148:269-277, (1975).
57. Richter, E., Feng, X.C. and Wiessler, M.:
Biotransformation of symmetric dialkyl nitrosamines in the
rat intestine.
Biochem.Pharmacol., 34:445-446, (1985)
58. Richter, E., Richter-Cooberg, U., Feng, X.C., Schulze, J. and
Wiessler, M.:
Intestinal metabolism of nitrosamines. 1. Transport and
metabolism of six nitrosamines in isolated rat small
intestinal segments.
Carcinogenesis, 7:1207-1213, (1986).
59. Rogers, A.E., Sanchez, O., Feinsod, F.M. and Newberne, P.M.:
Dietary enhancement of nitrosamine carcinogenesis.
Cancer Res., 34:96-99, (1974).
60. Sato, A., Nakajima, T. and Koyama, Y.:
Dose-related effects of a single dose of ethanol on the
metabolism in rat liver of some aromatic and chlorinated
hydrocarbons.
Toxicol.Appl.Pharmacol., 60:8-15, (1981).
61. Scanlan, R.A.:
Formation and occurrence of nitrosamines in food.
Cancer Res.(suppl.), 43:2435-2440, (1983).
62. Schmähl, D. and Habs, M.:
Carcinogenicity of N-nitroso compounds.
Oncology, 37:237-242, (1980).
63. Schwarz, M., Appel, K.E., Schrenk, D. and Kunz, W.:
Effect of ethanol on microsomal metabolism of dimethyl-
nitrosamine.
J.Cancer Res.Clin.Oncol., 97:233-240, (1980).
64. Schwenk, M., Frank, B., Bolt, H.M. and Winne, D.:
Intestinal first-pass effects of estrone sulfate and
estrone in the rat.
Arzneimittelforsch., 31:1254-1257, (1981).
65. Seitz, H.K.:
Alcohol effects on drug-nutrient interactions.
Drug-Nutrient Interactions, 4:143-146, (1985).

66. Spiegelhalder, B. and Preussmann, R.:
Occupational nitrosamine exposure. 1. Rubber and tyre industry.
Carcinogenesis, 4:1147-1152, (1983).
67. Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R.:
Volatile nitrosamines in food.
Oncology, 37:211-216, (1980).
68. Suzuki, E., Mochizuki, M., Shibuya, K. and Okada, M.
N,N-dibutyl nitrosamine metabolism by rat liver S9 fraction and oxidation by chemical model systems.
Gann, 74:41-50, (1983).
69. Swann, P.F. and Magee, P.N.:
Nitrosamine-induced carcinogenesis.
Biochem.J., 125:841-847, (1971).
70. Swann, P.F. and Magee, P.N.
Nitrosamine-induced carcinogenesis.
Biochem.J., 110:39-47, (1981).
71. Tannenbaum, S.R., Fett, D., Yong, V.R., Land, P.D. and Bruce, W.R.:
Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine.
Science, 200:1487-1488, (1978).
72. Tannenbaum, S.R.:
A model for estimation of human exposure to endogenous N-nitrosodimethylamine.
Oncology, 37:232-235, (1980).
73. Terracini, B., Magee, P.N. and Barnes, J.M.:
Hepatic pathology in rats on low dietary levels of dimethylnitrosamine.
Br.J.Cancer, 21:559-565, (1967).
74. Theiler, R.F., Sato, K., Aspelund, T.G. and Miller, A.F.:
Model system studies on N-nitrosamine formation in cured meats: the effect of curing solution ingredients.
J.Food Sci., 46:996-998, (1981).
75. Vogtmann, H. and Biedermann, R.:
The nitrate story - no end in sight.
Nutrition and Health, 1:217-239, (1985).

76. Wattenberg, L.W., Leong, J.L. and Strand, P.J.:
Benzpyrene hydroxyase activity in the gastro-intestinal tract.
Cancer Res., 22:1120-1124 (1962).
77. Williams, D.L.H. and Aldred, S.E.:
Inhibition of nitrosation of amines by thiols, alcohols and carbohydrates.
Food Chem.Toxicol., 30:79-81, (1982).
78. Winne, D. and Remischovsky, J.:
The influence of blood on the absorption of urea, methanol and ethanol from the jejunum of the rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 268:392-416, (1971).
79. Winne, H.G. and Müller, U.:
In vivo studies of mucosal transfer in rat jejunum.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 329:70-76, (1985).
80. Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T.:
A pharmacokinetic analysis program (Multi) for microcomputer.
J.Pharm.Dyn., 4:879-885, (1981).
81. Zwickenkflug, W.:
Metabolismus von N,N-Dibutylnitrosamin im Rattendarm.
Diplomarbeit der Chemie, München (1984).

7. TABELLEN

Tab.1 Gesamtradioaktivität (% der Dosis) im Blut in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgeclunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen und in einem Aliquot der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7

Zeit (min)	Gesamtradioaktivität (% der Dosis)			
1	1,0±0,4	1,9±0,8	1,2±0,6	0,8±0,3
2	2,3±0,5	2,4±0,5	2,7±1,1	1,9±0,3
3	3,3±0,9	3,7±0,7	3,6±1,2	2,4±0,3
4	3,6±1,2	5,5±1,2	3,6±0,7	2,6±0,4
5	4,4±0,9	5,5±1,2	5,0±1,5	2,5±0,3
6	4,2±0,4	4,9±1,1	4,8±1,1	2,8±0,3 ^a
7	4,5±0,7	3,8±0,8	3,6±0,7	2,7±0,6 ^a
8	3,6±0,3	4,0±0,6	4,9±0,8	2,3±0,4 ^a
9	3,0±0,4	4,1±0,8	3,7±0,6	2,0±0,2 ^a
10	2,5±0,3	3,4±0,9	3,5±0,4	1,7±0,2 ^a
12	5,2±0,7	6,4±0,8	6,6±0,8	3,6±0,6
14	3,7±0,5	5,0±0,6	4,7±0,5	3,2±0,7
16	2,9±0,4	3,5±0,5	4,2±0,4 ^a	2,2±0,4
18	2,3±0,4	2,8±0,3	4,0±0,6 ^a	1,8±0,3
20	2,3±0,3	2,7±0,2	2,9±0,4	2,1±0,4
22	1,8±0,1	2,4±0,3	2,6±0,5	1,8±0,3
24	1,8±0,2	2,4±0,3	2,4±0,4	1,5±0,3
26	1,3±0,2	2,1±0,2	2,0±0,4	1,5±0,3
28	1,2±0,2	1,3±0,2	1,7±0,4	1,1±0,2
30	1,2±0,1 ^b	1,6±0,2	1,3±0,3	1,3±0,3
32	1,0±0,1 ^b	1,3±0,2	1,1±0,3	1,1±0,3
34	0,9±0,1 ^b	0,9±0,9	1,0±0,3	1,0±0,2
36	1,0±0,1 ^b	1,2±0,2	1,0±0,2	0,7±0,2

a: signifikant verschieden von Gruppe A: $p < 0,05$.

b: Anzahl Versuche = 4.

Tab.2 Kumulative Gesamtradioaktivität (% der Dosis) im Blut

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen und in einem Aliquot der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7

Zeit (min)	Gesamtradioaktivität (% der Dosis)			
1	1,2±0,3	1,9±0,8	1,2±0,6	0,9±0,3
2	4,0±0,4	4,3±1,2	3,9±1,7	2,7±0,5
3	6,6±1,4	8,0±1,6	7,5±6,7	5,0±0,8
4	10,8±2,3	13,5±2,3	11,1±3,3	7,6±1,0
5	15,2±3,2	19,0±3,3	16,1±4,1	10,1±1,1
6	23,9±3,1	23,8±4,9	20,9±5,2	12,9±3,4
7	23,9±3,1	27,5±4,9	24,5±4,9	15,6±1,2 ^a
8	27,5±3,1	31,6±5,5	29,4±5,9	17,9±1,5 ^a
9	30,5±3,3	34,0±7,2	33,1±6,3	19,9±1,5 ^b
10	33,0±3,4	39,0±6,8	36,6±6,7	21,5±1,5 ^b
12	38,2±3,8	45,5±7,2	43,2±6,9	25,1±1,9 ^b
14	42,0±3,9	50,4±7,7	47,9±6,9	28,3±2,0 ^b
16	44,8±4,0	54,9±7,6	52,1±7,0	30,5±1,9 ^b
18	47,1±4,1	57,7±7,5	56,1±6,9	32,4±1,9 ^b
20	49,4±4,1	60,4±7,5	59,0±6,8	34,5±1,8 ^b
22	51,2±4,1	62,8±7,4	61,6±6,5	36,3±2,0 ^b
24	53,0±3,9	65,1±7,5	64,5±6,5	37,8±2,2 ^b
26	54,3±3,7	67,2±7,5	65,9±6,4	39,2±2,4 ^b
28	55,4±3,5	68,5±7,6	67,6±6,2	40,3±2,6 ^b
30	54,8±4,0 ^c	70,1±7,6	68,9±6,2	41,6±2,3 ^a
32	55,8±4,1 ^c	71,4±7,6	70,0±6,2	42,7±2,8 ^a
34	56,7±4,1 ^c	72,4±7,7	72,6±7,2	43,6±3,0 ^a
36	57,8±8,1 ^c	73,6±7,9	73,6±7,2	44,303,1 ^a

a,b: signifikant verschieden von Gruppe A: $p < 0,05$ (a) bzw. $p < 0,01$ (b).
c: Anzahl Versuche = 4.

Tab.3 Summe der Gesamtradioaktivität im Blut, Darmlumen und Darmgewebe (% der Dosis)

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Am Versuchsende wurde das Darmsegment mit 1 ml 0,9 % NaCl gespült und anschließend mit 3-4 ml Wasser homogenisiert. In einem Aliquot der Proben von Vollblut, Spülflüssigkeit und Homogenat wurde der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7
Gesamt-RA ^a im Blut	57,8±4,1	73,6±7,9	73,6±7,2	44,3±3,2 ^b
Gesamt-RA im Lumen	15,8±1,9	17,6±4,1	9,2±2,0 ^b	8,4±2,4 ^b
Gesamt-RA im Gewebe	7,1±1,2	11,5±3,4	10,9±1,7	10,5±1,3
Summe Gesamt-RA	81,6±2,8	102,2±5,4 ^b	91,8±7,4	63,4±6,1 ^b

a: Gesamt-RA = Gesamtradioaktivität.

b: Signifikant verschieden von Gruppe A: $p < 0,05$.

Tab.4 Aufnahme der Gesamtradioaktivität nach Applikation von ^{14}C -NDB in durchblutete Dünndarmschlingen

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurden 0,5 ml einer wäßrigen Lösung von ^{14}C -NDBA in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfend Blut wurde 36 min lang in ein-(erste 10 min) bis zweiminütigem Absta aufgefangan, gewogen und in einem Aliquot der Radioaktivitätsgehalt bestimmt. Die Mittelwerte für die kumulative Erscheinensrate (Prozen der Dosis) der einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe eines Comp terprogramms (70) der Gleichung

$$P_t = P_{\max} (1 - e^{-k(t - t_0)})$$

angepaßt, wobei die Symbole die folgende Bedeutung besitzen:

- P_t = kumulative Resorption zur Zeit t (Prozent der Dosis)
 $P_{\max}$ = maximale Resorption für $t \rightarrow \infty$ (Prozent der Dosis)
 k = Einbaukonstante (min^{-1})
 t = Versuchszeit (min)
 t_0 = Verzögerungszeit (min)
 AIC = Akaike's Information Criterion
 ss = Quadratsumme der Abweichungen der berechneten von den beobachteten Werten

Die Zahlenangaben entsprechen der mittleren Anpassung und deren Standardabweichung ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Der Ein- und Zweiminutenwert wurde nicht mit in die Berechnung aufgenommen.

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanolzusatz (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7
$P_{\max}$	59,05±0,30	77,43±0,46	78,52±0,60	48,67±0,4
k (min^{-1}) $\times 10^{-4}$	1020±19	838±17	769±17	674±16
$\text{HZ} = \ln 2 \times k^{-1}$ (min)	6,79	8,27	9,01	10,29
t_0 (min)	1,95±0,07	1,70±0,07	1,91±0,08	1,38±0,0
AIC	32,8	40,1	43,8	18,8
ss	3,59	5,07	6,05	1,84

Tab.5 Gesamtmetaboliten im Plasma (% der Dosis) in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dunndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0.9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Im Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Gehalt von NDBA und seinen Metaboliten gemessen. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7

Zeit (min)	Gesamtmetaboliten (% der Dosis)			
1-4	8,8±2,1	5,5±1,3	1,3±0,7 ^b	1,1±0,4 ^b
5-8	15,0±1,5	11,7±2,4	2,5±0,8 ^b	3,1±0,5 ^b
9-12	39,6±1,5	9,3±1,8	2,8±0,8 ^b	2,7±0,7 ^b
13-16	6,4±0,8	7,1±1,0	2,6±0,6 ^b	2,6±0,5 ^b
17-20	3,9±0,4	4,1±0,8	2,2±0,4 ^a	2,5±0,6
21-24	3,2±0,3	3,7±0,7	1,7±0,3 ^b	1,9±0,3 ^a
25-28	2,2±0,3 ^c	2,4±0,5	1,3±0,3	1,6±0,3 ^a
29-32	1,9±0,2 ^c	2,3±0,4	0,9±0,2	1,4±0,4 ^a
33-36	1,7±0,3 ^d	1,7±0,4	0,8±0,2 ^e	1,0±0,2 ^f

a,b: Signifikant verschieden von Gruppe A: $p < 0,05$
c,d,e,f: Anzahl Proben: 4 (c), 3 (d), 5 (e), 6 (f).

Tab.6 Kumulativer Gesamtmetabolitengehalt im Plasma (% der Dosis) in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines ca. 10 cm langen Dünndarmsegments wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0.9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Im Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Gehalt an NDBA und seinen Metaboliten gemessen. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7

Zeit (min)	Gesamtmetaboliten (% der Dosis)			
1-4	8,8±2,1	5,5±1,3	1,3±0,7 ^a	1,1±0,4 ^a
5-8	23,8±3,4	16,7±3,7	3,8±1,5 ^a	4,2±0,7 ^a
9-12	33,4±4,0	26,7±3,7	6,5±2,2 ^a	6,9±1,2 ^a
13-16	39,7±4,4	33,0±5,5	9,1±2,5 ^a	9,5±1,6 ^a
17-20	43,6±4,5	37,1±5,8	11,0±2,8 ^a	11,9±2,0 ^a
21-24	46,8±4,3	40,9±6,2	12,7±2,9 ^a	13,9±2,2 ^a
25-28	48,6±4,1 ^b	43,2±6,5	14,0±3,0 ^a	15,5±2,3 ^a
29-32	50,1±4,0 ^b	47,0±7,7	14,9±3,1 ^a	16,8±2,6 ^a
33-36	51,1±4,0 ^c	47,1±7,0	15,6±3,2 ^{a,d}	17,6±2,7 ^{a,e}

a: Signifikant verschieden von Gruppe A: $p < 0,05$.

b,c,d,e: Anzahl Proben: 4 (b), 3 (c), 5 (d), 6 (e).

Tab.7 Prozentualer Anteil der Gesamtmetaboliten, der sauren und der neutralen Metaboliten an der Gesamtradioaktivität sowie der prozentuale Anteil der sauren und der neutralen Metaboliten bezogen auf die Gesamtmetaboliten in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurden ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,5 ml 0,9 % NaCl, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. In Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Anteil von NDBA und seinen neutralen und sauren Metaboliten gemessen. Die Zahlenangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_x$).

A. Jejunum
NDBA-Dosis 17,6 nM
n=5

Zeit	NDBA	Gesamte Metaboliten	Saure Metaboliten	Neutrale Metaboliten
min	Prozent der Gesamtradioaktivität (Gesamtmetaboliten)			
1-4	24,9 $\pm$ 7,5	75,0 $\pm$ 7,5	38,6 $\pm$ 7,1 (49,8 $\pm$ 5,2)	36,5 $\pm$ 2,9 (50,2 $\pm$ 5,2)
5-8	11,0 $\pm$ 4,5	89,1 $\pm$ 4,5	50,9 $\pm$ 7,5 (56,6 $\pm$ 6,4)	38,2 $\pm$ 5,6 (43,4 $\pm$ 6,4)
9-12	3,0 $\pm$ 0,9	96,8 $\pm$ 1,1	58,9 $\pm$ 6,7 (60,7 $\pm$ 6,5)	37,9 $\pm$ 6,1 (39,3 $\pm$ 6,6)
13-16	3,0 $\pm$ 0,9	97,1 $\pm$ 0,8	63,0 $\pm$ 7,5 (64,9 $\pm$ 7,7)	34,2 $\pm$ 7,5 (35,2 $\pm$ 7,7)
17-20	6,4 $\pm$ 2,8	93,7 $\pm$ 2,8	57,0 $\pm$ 6,4 (57,0 $\pm$ 6,4)	40,7 $\pm$ 7,0 (43,0 $\pm$ 6,4)
21-24	5,3 $\pm$ 2,1	93,4 $\pm$ 3,0	57,6 $\pm$ 7,3 (64,6 $\pm$ 8,4)	35,8 $\pm$ 9,4 (37,4 $\pm$ 9,4)
25-28 ^a	5,2 $\pm$ 2,6	95,0 $\pm$ 2,8	50,7 $\pm$ 5,6 (54,0 $\pm$ 7,3)	44,2 $\pm$ 7,9 (46,0 $\pm$ 7,3)
29-32 ^a	5,7 $\pm$ 2,8	94,3 $\pm$ 2,8	56,4 $\pm$ 11,0 (60,0 $\pm$ 11,7)	37,9 $\pm$ 11,7 (39,9 $\pm$ 11,7)
33-36 ^b	6,7 $\pm$ 2,5	93,3 $\pm$ 2,5	49,8 $\pm$ 5,0 (53,4 $\pm$ 4,9)	43,5 $\pm$ 4,6 (46,6 $\pm$ 4,9)

a,b: Anzahl Versuche: 4 (a), 3 (b).

B. Jejunum
NDBA-Dosis 12,9 nM
n=6

Zeit	NDBA	Gesamte Metaboliten	Saure Metaboliten	Neutrale Metaboliten
min	Prozent der Gesamtradioaktivität (Gesamtmetaboliten)			
1-4	59,9±3,9 ^b	40,2±3,9 ^b	15,2±1,1 ^b (39,9±4,6)	24,9±4,1 (60,1±4,6)
5-8	35,7±4,3 ^b	5,5±4,8 ^b	23,3±6,2 ^b (34,4±7,0)	42,2±4,7 (65,6±7,0)
9-12	30,1±6,8 ^b	8,2±6,0 ^b	24,1±4,3 ^b (36,2±7,1)	44,1±5,9 (63,8±7,1)
13-16	25,7±7,3 ^a	4,3±7,4 ^a	23,9±4,4 ^b (31,7±3,8)	50,4±4,7 (68,3±3,8)
17-20	26,5±8,3	3,7±8,3	19,8±3,2 ^b (28,4±5,1)	53,9±8,3 (71,6±5,1)
21-24	26,0±7,9 ^a	4,7±8,2	21,9±2,0 ^b (31,3±5,0)	52,8±8,3 (68,8±5,0)
25-28	30,0±8,9	0,0±8,8	25,2±3,6 ^b (38,1±5,9)	44,8±7,8 (61,9±5,9)
29-32	17,6±6,6	2,4±6,6	25,2±2,6 ^a (31,5±3,7)	57,2±6,7 (68,5±3,7)
33-36	23,3±6,8	7,7±7,6	31,1±6,4 (42,4±8,9)	46,6±10,3 (57,7±8,9)

a,b: Signifikant Verschieden vom Gruppe A: $p < 0,05$ (a) bzw.
 $p < 0,01$ (b).

C. Jejunum
NDBA-Dosis 605 nM
n=6

Zeit	NDBA	Gesamte Metaboliten	Saure Metaboliten	Neutrale Metaboliten
min	Prozent der Gesamtradioaktivität (Gesamtmetaboliten)			
1-4	89,0±2,6 ^b	11,0±2,6 ^b	8,1±2,7 ^b (65,0±8,9)	3,0±0,8 (35,0±8,9)
5-8	85,7±3,2 ^b	14,0±2,9 ^b	8,9±3,0 ^b (59,8±7,6)	5,0±1,0 (40,2±7,6)
9-12	77,5±3,9 ^b	22,3±3,9 ^b	12,5±3,6 ^b (53,7±7,3)	9,9±1,8 (46,3±7,2)
13-16	69,1±4,6 ^b	30,9±4,6 ^b	18,4±3,7 ^b (61,5±8,4)	12,4±2,7 (38,5±8,4)
17-20	63,0±5,8 ^b	36,9±5,8 ^b	22,8±3,9 ^b (63,6±6,8)	14,1±3,1 (36,4±6,8)
21-24	58,4±7,3 ^b	36,1±6,2 ^b	19,8±4,8 ^b (53,9±7,3)	16,3±3,6 (46,1±7,3)
25-28	56,1±10,8 ^b	42,9±10,4 ^b	28,8±10,1 (64,3±8,6)	14,1±4,7 (34,1±8,0)
29-32	60,6±8,0 ^b	41,0±7,3 ^b	24,9±5,3 ^a (68,1±7,5)	14,5±5,7 (31,9±7,5)
33-36	57,7±7,9 ^b	42,3±7,9 ^b	26,2±3,8 ^b (64,1±8,8)	16,1±7,0 (33,9±9,9)

a,b: Signifikant Verschieden vom Gruppe A: $p < 0,05$ (a) bzw.
 $p < 0,01$ (b).

D. Ileum
NDBA-Dosis 12,9 nM
n=7

Zeit	NDBA	Gesamte Metaboliten	Saure Metaboliten	Neutrale Metaboliten
min	Prozent der Gesamtradioaktivität (Gesamtmetaboliten)			
1-4	85,7 $\pm$ 3,1 ^b	14,4 $\pm$ 3,0 ^b	6,2 $\pm$ 1,3 ^b (46,0 $\pm$ 5,5)	8,2 $\pm$ 1,9 (54,0 $\pm$ 5,5)
5-8	63,6 $\pm$ 8,4 ^b	35,3 $\pm$ 8,0 ^b	16,8 $\pm$ 4,0 ^b (44,2 $\pm$ 2,0)	19,9 $\pm$ 4,5 (55,8 $\pm$ 2,0)
9-12	51,9 $\pm$ 10,2 ^b	47,3 $\pm$ 8,7 ^b	21,9 $\pm$ 5,5 ^b (48,8 $\pm$ 5,5)	24,0 $\pm$ 4,1 (51,1 $\pm$ 5,6)
13-16	46,0 $\pm$ 10,8 ^b	53,1 $\pm$ 10,8 ^b	24,5 $\pm$ 6,4 (42,0 $\pm$ 4,2)	28,6 $\pm$ 4,9 (56,6 $\pm$ 4,6)
17-20	42,7 $\pm$ 10,1 ^b	56,5 $\pm$ 9,9 ^a	27,2 $\pm$ 6,3 ^a (49,7 $\pm$ 7,7)	27,3 $\pm$ 6,4 (50,3 $\pm$ 7,7)
21-24	37,0 $\pm$ 7,3 ^b	63,1 $\pm$ 7,3 ^b	31,7 $\pm$ 5,3 ^a (50,0 $\pm$ 4,6)	31,3 $\pm$ 4,1 (50,2 $\pm$ 4,5)
25-28	28,8 $\pm$ 5,8 ^a	66,4 $\pm$ 6,3 ^b	38,0 $\pm$ 8,2 (54,0 $\pm$ 8,1)	28,4 $\pm$ 4,2 (46,0 $\pm$ 8,1)
29-32	35,6 $\pm$ 8,7 ^a	61,6 $\pm$ 8,2 ^a	33,7 $\pm$ 7,2 (60,8 $\pm$ 2,3)	29,4 $\pm$ 4,3 (47,8 $\pm$ 4,7)
33-36	29,6 $\pm$ 7,6	69,4 $\pm$ 8,3	39,7 $\pm$ 7,5 (58,0 $\pm$ 8,3)	29,7 $\pm$ 7,4 (42,0 $\pm$ 8,3)

a,b: Signifikant Verschieden vom Gruppe A: p < 0,05 (a) bzw.
p < 0,01 (b).

Tab. 2 Summe der Gesamtmetaboliten, der sauren und der neutralen Metaboliten in Prozent der Gesamtradioaktivität und Summe der sauren und neutralen Metaboliten in Prozent der Gesamtmetaboliten im Plasma nach 36 Minuten.

Nach Venotomie der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurde NDBA, gelöst in 0,5 % NaCl 0,5 ml, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgeclaudet. Das austropfende Blut wurde 16 min lang in ein (erste 10 min) bis zweiminütigen Abstand aufgefangen. In Plasmasammelproben von jeweils 4 min wurde mittels HPLC der Anteil von NDBA, neutralen und sauren Metaboliten gemessen. Die Zählensangaben entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung vom Mittelwert ($\bar{x} \pm s_x$).

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (%, v/v)	-	1,0	-	-
Anzahl Versuche	5	6	6	7
Prozent der Gesamtradioaktivität (Gesamtmetaboliten)				
NDBA	9,8 $\pm$ 2,9	11,2 $\pm$ 7,1	74,8 $\pm$ 3,8	51,8 $\pm$ 7,0
Metaboliten gesamt	88,2 $\pm$ 2,0	66,9 $\pm$ 7,4 ^a	22,2 $\pm$ 3,2 ^b	40,9 $\pm$ 5,3 ^b
neutral	36,9 $\pm$ 4,6 (41,9 $\pm$ 5,2)	44,1 $\pm$ 4,8 (65,9 $\pm$ 2,9)	8,6 $\pm$ 2,1 ^b (29,0 $\pm$ 7,5)	20,9 $\pm$ 2,9 ^a (51,3 $\pm$ 4,3)
saure	51,3 $\pm$ 4,8 (58,1 $\pm$ 5,2)	22,8 $\pm$ 3,2 ^b (33,6 $\pm$ 2,4)	13,6 $\pm$ 2,9 ^b (61,5 $\pm$ 7,5)	19,4 $\pm$ 3,6 ^b (46,4 $\pm$ 3,9)

a, b: Signifikant verschieden von Gruppe A: p < 0,05 (a), bzw. p < 0,01 (b).

Tab.9 Blutfluß in Dünndarmsegmenten in Abhängigkeit von der Zeit

Nach Kanülierung der abführenden Vene eines Dünndarmsegments von ca. 10 cm Länge wurde ^{14}C -NDBA, gelöst in 0,9 % NaCl 0,5 ml, in das Segment injiziert und dieses anschließend abgebunden. Das abtropfende Blut wurde 36 min lang in ein- (erste 10 min) bis zweiminütigem Abstand aufgefangen. Die Zahlenangaben entsprechen der abtropfenden Blutmenge (μl) exemplarisch von je einem Versuch der verschiedenen Versuchsserien.

Gruppe	A	B	C	D
Darmsegment	Jejunum	Jejunum	Jejunum	Ileum
Darmlänge (cm)	10	10	9,5	10
NDBA-Dosis (nM)	17,6	12,9	605	12,9
Ethanol (% v/v)	-	1,0	-	-
Blutdruck (mmHg)	100/80	110/100	100/90	120/110
Datum	17.10.84	4.6.85	1.2.85	22.11.84

Zeit (min)	Blutvolumen (μl)			
1	202	300	584	407
2	212	244	327	222
3	271	318	316	276
4	303	315	322	305
5	312	315	314	325
6	326	392	380	320
7	318	241	267	355
8	332	394	304	335
9	333	288	310	417
10	345	321	331	267
12	728	745	627	691
14	801	768	668	746
16	817	821	680	773
18	811	729	783	734
20	779	663	862	740
22	670	634	943	742
24	606	784	1038	803
26	634	710	996	769
28	703	725	920	732
30	707	744	894	733
32	713	639	851	721
34	735	611	864	748
36	816	955	1047	827

8. BEDEUTUNG VERWENDETER KÜRZEL

ADH	Alcoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
HPLC	High-pressure-liquid-chromatography
HB2HBA	N-Nitroso-butyl-(N-2-hydroxybutyl)amin
HB3HBA	N-Nitroso-butyl-(N-3-hydroxybutyl)amin
HB4HBA	N-Nitroso-butyl-(N-4-hydroxybutyl)amin
HBOPA	N-Nitroso-butyl-(N-3-carboxypropyl)amin
NDAA	N-Nitroso-dipentylamin
NDBA	N-Nitroso-diäthylamin
NDEA	N-Nitroso-diethylamin
NDMA	N-Nitroso-dimethylamin
NDPA	N-Nitroso-diäthylamin
NPZP	N-Nitroso-pyrrolidin
RA	Radioaktivität

LEBENS LAUF

Name:	Xu-Chang Feng
Geburtstag:	05.11.1942
Geburtsort:	Shanghai, China
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	
1949-1955	6 Jahre Grundschule
1955-1961	6 Jahre Mittel-Hochschule (entspr. Gymnasium)
	mit Erlangung der Hochschulreife
Berufsausbildung:	
1961-1967	6 Jahre Studium an der Medizinischen Universität Shanghai
	Medizinisches Staatsexamen
Beruflicher Werdegang:	
1967-1978	Krankenhaustätigkeit als Arzt, insbesondere auf den Gebieten der Chirurgie und der inneren Medizin
1978-1981	Post Graduate Student im Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität Shanghai
	Abschluß mit dem Master Degree
1981-1983	Weitere wissenschaftliche Tätigkeit am Pharmakologischen Institut und Planungsleiter für Studiengänge
seit 1983	Gastwissenschaftler am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität München
	Anerkennungsprüfung für das deutsche medizinische Staatsexamen (1986)
	Medizinische Doktorarbeit (1984-1986)

DANKSAGUNG

Von ganzem Herzen danke ich Herrn Professor Dr. W. Forth für seine umfassende Unterstützung, die Ermöglichung dieser Arbeit und die Überlassung des Themas.

Ebenfalls von ganzem Herzen danke ich Herrn Dr. E. Richter für seine bereitwillige Unterstützung und seinen wertvollen Rat bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Kollegen in meiner Gruppe und im Institut für manche Erleichterungen bei meiner Arbeit.

